Vorkommen und diagnostische Bedeutung von Antikörpern gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA) bei Kollagenosen

Eva Dittler

Diss. München
1984

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik

der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. O. Braun-Falco

VORKOMMEN UND DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN EXTRAHIERBARE NUKLEÄRE ANTIGENE (ENA) BEI KOLLAGENOSEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Eva Dittler

aus

Fürstenfeldbruck

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. O. Braun-Falco

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.4.84

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL	5
METHODEN	6
I. Voruntersuchungen	6
1. Nachweis von ANA	6
2. Nachweis von DNA-Ak	7
II. Nachweis von Ak gegen ENA	8
1. ENA-Präparation	8
2. Herstellung von 1 %igem Agarose-Gel	8
3. Herstellung von Agarplatten für die Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony	9
4. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony zum Nachweis von ENA-Ak	9
III. Differenzierung von ENA-Antikörpern	11
1. Enzymatische Vorbehandlung der ENA-Präparation	11
2. Durchführung und Auswertung des Tests	12
IV. Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der ENA-Ak	14
1. Gegenstromimmunelektrophorese	15
2. Hämagglutinationsmethode	16
ERGEBNISSE	
A. Experimentelle Untersuchungen	17
I. Screening: Häufigkeit von Antikörpern gegen ENA in ANA-positiven Seren	17
II. Kernfluoreszenzmuster der ENA-positiven und ENA-negativen Seren	19
III. ANA-Titer von ENA-positiven und ENA-negativen Seren	20
IV. Bestimmung der Titer von Ak gegen ENA	22
V. Vorkommen und Häufigkeit von Antikörpern gegen den RNAse-empfindlichen und den RNAse-resistenten ENA-Anteil	23
VI. Vergleich verschiedener Bestimmungsmethoden zum Nachweis von ENA-Ak	25
1. Gegenstromimmunelektrophorese (CIE)	25
2. Hämagglutinationsmethode	25

Seite

B. Klinische Untersuchung 28
I. Geschlechts- und Altersverteilung der ENA-positiven Patienten 28
II. Vorkommen von ENA-Ak bei verschiedenen Kollagenosen 30
III. Klinische Befunde und Laborbefunde bei Patienten mit anti-RNP-Ak 34
1. Klinische Befunde 34
2. Laborbefunde 35
IV. Klinische Befunde und Laborbefunde bei Patienten mit MCTD 40

DISKUSSION 43
1. Untersuchungsmaterial 43
2. Methode 44
3. Ergebnisse (mit Synopsis der MCTD) 45

ZUSAMMENFASSUNG 60

LITERATURVERZEICHNIS 62

Abkürzungen:

ANA	antinukleäre Antikörper
ENA	extrahierbare nukleäre Antigene
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
DNP	Desoxyribonukleoprotein
RNP	Ribonukleoprotein
Ak	Antikörper
Ag	Antigen
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
DIF	direkte Immunfluoreszenz
CIE	Gegenstromimmunelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte isotone Kochsalzlösung
SLE	systemischer Lupus erythematodes
PSS	progressive systemische Sklerodermie
DM	Dermatomyositis
PM	Polymyositis
CDLE	chronisch discoider Lupus erythematodes
MCTD	mixed connective tissue disease (Sharp-Syndrom)
GN	Glomerulonephritis

EINLEITUNG

Antinukleäre Antikörper (ANA) sind wichtige serologische Parameter für die Erkennung und Unterscheidung chronisch-entzündlicher Erkrankungen des Gefäß-Bindegewebs-Systems (Kollagenosen). Unter der heute umstrittenen Bezeichnung "Kollagenose", die der amerikanische Pathologe Klemperer (59) prägte, faßt man eine Gruppe von Erkrankungen zusammen, die pathologisch-anatomisch durch Ablagerung von fibrinoid degeneriertem Material in der Bindegewebsgrundsubstanz gekennzeichnet sind. Die Ätiologie dieser Erkrankungen ist noch heute weitgehend unbekannt und wahrscheinlich für die einzelnen Krankheiten unterschiedlich. Die Abgrenzung gegenüber dem rheumatischen Formenkreis ist unscharf.

Zu den Kollagenosen im engeren Sinn zählt man heute den systemischen Lupus erythematodes (SLE), die Periarteriitis nodosa, die Riesenzellarteriitis, die Dermatomyositis (DM) und Polymyositis (PM), die progressive systemische Sklerodermie (PSS) und das Sjögren-Syndrom (49). Gemeinsam ist diesen Bindegewebskrankheiten der Befall mehrerer Organsysteme; daher bereitet die Differentialdiagnose allein aufgrund der klinischen Symptomatik in vielen Fällen große Schwierigkeiten.

Die Möglichkeit einer serologischen Diagnostik war erstmals 1948 mit der Entdeckung des LE-Zellphänomens durch Hargraves (47) gegeben. Es handelt sich dabei um den in vitro- Nachweis von phagozytiertem Zellmaterial geschädigter Leukozyten in Granulozyten. Miescher et al. konnten

1954 beweisen, daß diese Nukleophagozytose durch antinukleäre Antikörper (ANA) im Serum der Patienten bewirkt wird (74). Heute hat der LE-Zelltest an Bedeutung verloren, da er aufwendig ist und zudem, wie man mittlerweile weiß, nur Antikörper (Ak) gegen Desoxyribonukleoprotein (DNP), nicht aber gegen andere Zellkernbestandteile erfaßt (71).

ANA kommen vor allem bei SLE (73), aber auch bei anderen Krankheiten vor, insbesondere bei chronischer Polyarthritis (cP) (65,104), progressiver oder zirkumskripter Sklerodermie (12,33,54,104,129), medikamentös-induziertem LE (18,105,122), Sjögren-Syndrom (17), chronisch-aggressiver Hepatitis (CAH) (72), Dermatomyositis (DM) (35,106), primärbiliärer Zirrhose (72), Myasthenia gravis, Periarteriitis nodosa, bei Überlappungssyndromen wie der sogenannten Mixed connective tissue disease (MCTD) oder dem Sharp-Syndrom, bei Malignomen und in niedrigen Titern bei Gesunden in höherem Lebensalter (16,38,51,71,104).

Das weitaus gebräuchlichste diagnostische Verfahren zur Bestimmung der ANA ist heute der indirekte Immunfluoreszenz (IIF)-Test. Durch die Bestimmung der Titer (16, 81,101) und des Kernbindungsmusters von ANA (20,21,22,121) im IIF-Test und durch die Differenzierung von ANA-Untergruppen mit definierter Antigenspezifität konnte das diagnostische Spektrum der ANA erweitert werden.

Die Bedeutung der verschiedenen Kernfluoreszenzmuster im IIF-Test war zunächst nicht bekannt. Später hat man beobachtet, daß ANA bei verschiedenen Erkrankungen unterschiedliche Bindungsmuster im IIF-Test erzeugen, da

sie gegen unterschiedliche Kernbestandteile gerichtet sind, und so zusätzliche diagnostische Hinweise liefern (21,22, 23,28,82,121,123,127). So kommt das membranöse (=ringförmige, =periphere) Bindungsmuster, das charakteristisch ist für Ak gegen Desoxyribonukleinsäure (DNA) (27,39,52,55,64,132), gehäuft bei aktivem systemischen LE vor (127). Patienten mit diesem Muster entwickeln in 60 % eine Nierenbeteiligung (2o, 22). Das homogene Muster ist auf Ak gegen DNP zurückzuführen. Es ist relativ unspezifisch und kommt in niedrigen Titern sogar bei Gesunden vor, insbesondere bei Personen über 60 Jahren (22,83,71,104). Das nukleoläre Muster, wahrscheinlich durch Ak gegen Ribonukleinsäure (RNA) hervorgerufen, erscheint in hohen Titern hauptsächlich bei PSS (22,86,101,102), häufig auch bei Sjögren-Syndrom und Morbus Raynaud, selten und in niedrigen Titern bei SLE und cP. ANA mit gefleckten ("speckled") Bindungsmuster im IIF-Test sind vorwiegend gegen lösliche, in Puffern extrahierbare nukleäre Antigene (ENA) gerichtet (67,82, 97,114,121). ENA setzt sich aus verschiedenen Antigenfraktionen zusammen, von denen das Ribonukleoprotein (RNP)-Antigen (67), ein Komplex aus Zellkernmatrixproteinen und kurzkettigen Ribonukleinsäuren (63), und das sogenannte Sm-Antigen (126) am besten untersucht sind (36,62). Wahrscheinlich enthält das ENA-Gemisch weitere Antigenfraktionen, die aber biochemisch noch weniger genau charakterisiert sind (2,7,8,99,129,135,137). Ein besonderes Interesse haben die Ak gegen ENA in den letzten zehn Jahren erfahren: in hohen Titern gelten sie als typisch

für die sogenannte MCTD, eine erstmals 1972 von Sharp et al. (114) bei 25 Patienten beschriebene Mischkollagenose mit Symptomen des SLE, der PSS und der Dermato/Polymyositis. Mittels der passiven Hämagglutination konnte gezeigt werden, daß die Ak bei MCTD gegen den RNP-Anteil des ENA gerichtet sind. Auch aufgrund dieser serologischen Besonderheit wurde die Mischkollagenose als eigenständiges Krankheitsbild angesehen (85,107,108,111,113,114,115), das bei uns auch unter dem Namen Sharp-Syndrom bekannt geworden ist.

In der vorliegenden Arbeit wird das Vorkommen von Ak gegen ENA und seine Fraktionen RNP und Sm bei Patienten mit verschiedenen Kollagenosen untersucht. Insbesondere soll geprüft werden, ob diese Ak Bedeutung für die Differenzialdiagnose verschiedener Erkrankungen aus diesem Spektrum haben.

MATERIAL

Der Nachweis von Ak gegen ENA wurde in 795 Seren durchgeführt. Die Seren stammten von 304 Patienten der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München (Leiter: Prof. Dr. Dr.h.c. Otto Braun-Falco), die in den Jahren 1976 bis 1980 zum Teil ambulant, zum Teil stationär betreut worden waren. Ein kleiner Teil der Seren war von auswärtigen Kliniken oder niedergelassenen Ärzten eingeschickt worden.

Bei allen Patienten war ursprünglich entweder wegen Verdachtes auf das Vorliegen oder zum Ausschluß einer Kollagenose eine Untersuchung auf antinukleäre Antikörper (ANA) mittels direktem Immunfluoreszenz (IIF)-Test veranlaßt worden.

Sämtliche 795 in dieser Arbeit nachuntersuchten Seren waren im IIF-Test ANA-positiv. Da ANA in niedrigen Titern (bis 1:40) bei mehr als 10 % der Normalbevölkerung über 60 Jahren nachgewiesen werden können (81), wurden nur Seren mit ANA-Titern größer als 160 bei homogenem bzw. größer als 40 bei geflecktem ("speckled") Kernfluoreszenzmuster ausgewählt für weitere Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen ENA.

Alle Seren waren bei - 20 Grad Celsius aufbewahrt worden.

METHODEN

I. Voruntersuchungen

1. Nachweis von ANA: Die antinukleären Antikörper (ANA) wurden routinemäßig im immunologischen Labor der Dermatologischen Klinik in einer Modifikation der Methode von Friou (37) im indirekten Immunfluoreszenztest bestimmt. Als Antigensubstrat dienten Kryostatschnitte von Rattenlebern mit einer Dicke von 6 µm. Diese wurden auf Objektträgern 30 Minuten an der Luft getrocknet und weitere 3o Minuten mit dem Patientenserum in 1:40 Verdünnung bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Jeder Test wurde mit einem positiven und einem negativen Kontrollserum durchgeführt. Nach dreimaligem Spülen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 7,1 wurden die Rattenleberschnitte in feuchter Kammer bei Zimmertemperatur 30 Minuten mit fluoreszenzmarkiertem Ziegenserum gegen humanes IgG (Verdünnung 1:160 / F/P-Ratio 2,5) und gegen humanes IgM (Verdünnung 1:60 / F/P-Ratio 3,2) (Fa. Hyland, München) inkubiert. Zur Entfernung von nicht gebundenem Antiserum wurden die Objektträger anschließend erneut je zehn Minuten mit Puffer gespült und mit Glycerin/Puffer im Verhältnis 9:1 eingedeckt. Unmittelbar anschließend erfolgte die Ablesung mit einem UV-Fluorezenzmikroskop (Fa. Leitz, Wetzlar). Dabei wurde das

Muster der Kernfluoreszenz und die Immunglobulinklasse der Ak bestimmt. Die ANA-positiven Seren wurden in geometrischer Reihe verdünnt (1:40 / 1:80 / 1:160 etc.) und die Serumverdünnung, welche noch eine deutlich ablesbare Kernfluoreszenz erzeugte, wurde als ANA-Endtiter angegeben.

2. Nachweis von DNA-Ak: ANA-positive Seren von Patienten mit Verdacht auf SLE wurden seit 1978 zusätzlich in einem Radioimmunoassay (RIA) auf das Vorkommen von Ak gegen DNA untersucht (1). Bei einem Teil der ENA-positiven Seren von Sklerodermie-Patienten wurden die DNA-Ak nachträglich bestimmt.

Die Bestimmung der DNA-Bindungskapazität im Serum erfolgte in einem standardisierten Test mit Radioassaykit (mit J^{125}-markierter DNA) (Fa. Buchler, Braunschweig) nach der von der Firma angegebenen Vorschrift. Nach Angaben des Herstellers und Berichten in der Literatur (26) werden mit diesem Testansatz vorwiegend Ak gegen doppelsträngige DNA (ds-DNA) bestimmt.

Eine DNA-Bindungskapazität über 25 U/ml wurde als signifikant positiv gewertet, Werte zwischen 20 und 25 U/ml als grenzwertig eingestuft.

II. Nachweis von Ak gegen ENA

1. ENA-Präparation: 120 mg eines lyophilisierten Extrakts aus Kaninchen-Thymuszellen (Fa. Pel-Freeze Biologicals, Rogers, Arkansas) wurden in 0,15 M phosphatgepufferter isotoner Kochsalzlösung (PBS) pH 7,2 (0,77 g NaCl, 0.386 g NaH_2PO_4, 1,02 g Na_2HPO_4 in 1000 ml aqua dest.) gelöst und bei 4 Grad C über Nacht mit einem Magnetstab gerührt. Der Ansatz wurde anschließend 30 Minuten bei 10000 g und 4 Grad C zentrifugiert und der Überstand als extrahierbares nukleäres Antigen (ENA) verwendet. Der Proteingehalt des Überstandes wurde mittels der Methode nach Lowry (66) bestimmt.

Die ENA-Präparation wurde mit PBS auf eine Proteinkonzentration von 15 mg/ml eingestellt und als Stammlösung bei - 20 Grad C aufbewahrt, da RNA-haltige Antigene sogar bei Kühlschranktemperaturen an Antigenaktivität einbüßen (96). Vor der Durchführung des Tests auf ENA-Ak wurde davon eine Arbeitslösung mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml hergestellt.

2. Herstellung von 1 %igem Agarose-Gel: 4 g Agarose L (Behringwerke, Marburg) wurden durch Erhitzen in 300 ml aqua dest. und 100 ml 0,15 M PBS pH 7,1 gelöst (14,26 g Na_2HPO_4 , 6,74 g KH_2PO_4 in 1000 ml aqua dest.). Zur Vermeidung von bakterieller oder Pilzüberwucherung des Gels wurden ca. 40 mg Natriumacid zugegeben.

3. Herstellung von Agarplatten für die Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony: Anti-Newton-Diapositivgläser (4,8 x 4,8 cm) wurden gewaschen und zum Entfetten in einem 1:1 Gemisch aus Isopropanol und Aceton aufbewahrt. Die gereinigten und getrockneten Gläser wurden nach der Blutausstrichmethode mit 1 %igem Agarose-Gel vorbeschichtet. Dann wurden 4 ml auf 60 Grad C erhitzte Agarose in ein Reagenzglas pipettiert und dieses auf die vorbeschichteten Diagläser ausgegossen. Nach Erstarren des Gels wurden Löcher ausgestanzt, wobei sechs Außenlöcher regelmäßig um ein zentrales Loch angeordnet waren (Abb. 1). Die Löcher hatten einen Durchmesser von 7 mm und einen Abstand von 3 mm voneinander. Die Gelplatten wurden in einer feuchten Kammer im Kühlschrank bei 4 Grad C aufbewahrt und innerhalb einer Woche verwendet.

4. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony zum Nachweis von ENA-Ak:

a. Screening: Der Nachweis von Ak gegen ENA erfolgte mittels der Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony (60,84,126). In das zentrale Loch der Agarplatte wurden 50 µl ENA (Proteinkonzentration 10 mg/ml), in die sechs umgebenden Löcher je 50 µl unverdünntes Patientenserum pipettiert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, so daß in die jeweils gegenüberliegenden Löcher Serum vom gleichen Patienten gegeben wurde. Pro Agarplatte konnten so drei Patientenseren untersucht werden (Abb. 1).

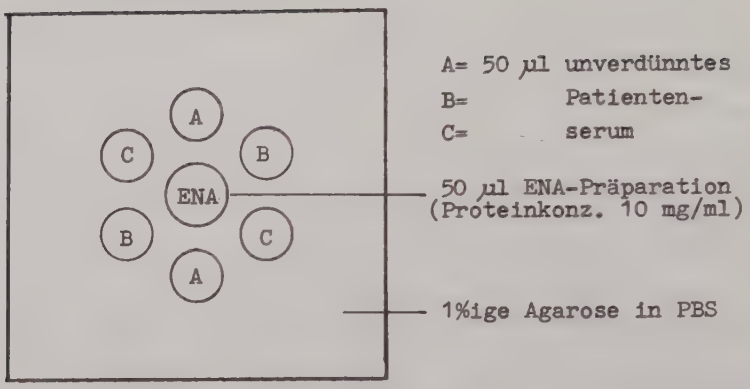


Abb 1: Anordnung der Patientenseren zum Nachweis von Ak gegen ENA in der Immundoppeldiffusion

Die mit Serum beschickten Gelplatten wurden in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur inkubiert und die Gelpräzipitation nach 24, 48 und 72 Stunden mit der Lupe vor einer hellen Lampe bei Beleuchtung von unten abgelesen.

b. Bestimmung des ENA-Ak-Titers: In Seren, die unverdünnt eine Präzipitatlinie mit ENA ausbildeten, wurde anschließend der ENA-Ak-Titer quantitativ bestimmt: eine mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellte geometrische Serumverdünnungsreihe (1:2 , 1:4 , 1:8 etc.) wurde in der gleichen Anordnung wie im Screening-Test erneut untersucht (Abb. 2). Der reziproke Wert der Verdünnung, die noch eine deutlich sichtbare Präzipitatlinie erzeugte, wurde als ENA-Ak-Titer angegeben.

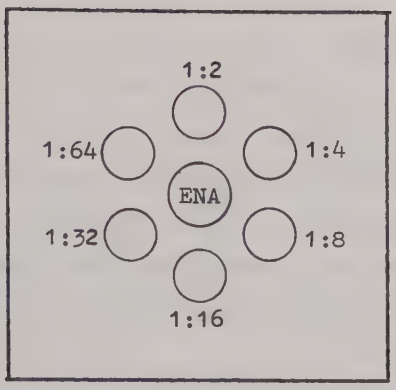


Abb. 2: Immundoppeldiffusion zu Bestimmung der ENA-Ak-Titer

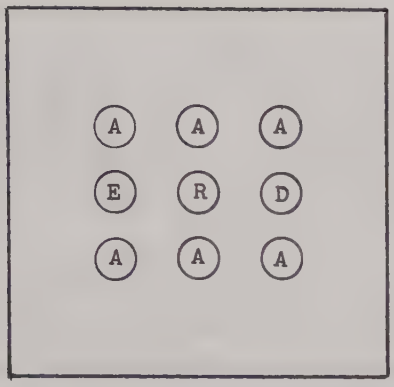
III. Differenzierung von ENA-Antikörpern

Da das RNP-Antigen durch RNAse zerstört wird (67, 69,85,97) und das Sm-Antigen im Gegensatz dazu RNAse-resistent ist (69,126), können spezifische Ak gegen eine dieser beiden ENA-Fraktionen durch enzymatische Vorbehandlung des Kaninchenthymusextrakts mit RNAse unterschieden werden.

1. Enzymatische Vorbehandlung der ENA-Präparation: Ribonuklease A, Typ III und Desoxyribonuklease I von Rinderpankreas (Sigma Chemical Company, St. Louis) wurden in PBS pH 7,2 gelöst. Dem Puffer war 6 mM $MgCl_2$ zugesetzt. Die RNAse-lösung wurde auf eine Konzentration von 3 mg/ml, die DNAse-Lösung auf 1,5 mg/ml PBS-$MgCl_2$ eingestellt und bis zum Verbrauch bei - 20 Grad C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde die RNAse-Lösung fünf Minuten lang auf 56 Grad C erhitzt, um eventuell zusätzlich vorhandene DNAse-Restaktivität zu zer-

stören (78). Die Enzymlösungen wurden mit der ENA-Stammlösung (Proteinkonzentration 15 mg/ml) in einem Volumenverhältnis von 1 (Enzymlösung) zu 2 (ENA-Substrat) angesetzt und eine Stunde bei 37 Grad C inkubiert. Nach Abbruch der Enzymreaktion wurde das Inkubationsgemisch zehn Minuten bei 4 Grad C und 10000 g zentrifugiert und der Überstand bis zur Verwendung bei -20 Grad C eingefroren.

2. Durchführung des Tests: Der Nachweis von Ak gegen die RNAse-empfindliche oder RNAse-resistente ENA-Fraktion erfolgte ebenfalls mittels der Immundiffusion in 1 %igem Agarose-Gel. Die Versuchsanordnung war, wie Abb. 3 zeigt, modifiziert. Es wurden drei senkrechte Reihen mit jeweils drei Löchern (Durchmesser 6 mm) in einem Abstand von 3 mm ausgestanzt. In die drei oberen und unteren Löcher (A in Abb. 3 und 4) wurden je 50 µl unverdünntes Serum, in das mittlere Loch der linken Reihe 50 µl unbehandeltes ENA (E), in das der mittleren Reihe 50 µl RNAse-behandeltes ENA (R) und in das der rechten Reihe 50 µl DNAse-behandeltes ENA (D) pipettiert. Wie bei der Untersuchung auf ENA-Ak wurde die Präzipitationsreaktion bei Zimmertemperatur in feuchter Kammer durchgeführt und das Ergebnis nach 24, 48 und 72 Stunden mit der Lupe bei Beleuchtung von unten abgelesen.

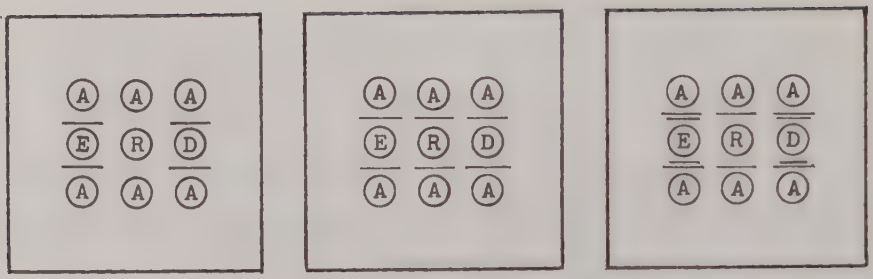


A= 50 µl unverdünntes Patientenserum
E= 50 µl unbehandeltes ENA
R= 50 µl RNAse-behandeltes ENA
D= 50 µl DNAse-behandeltes ENA

Abb. 3: Immundoppeldiffusion zum Nachweis von Ak gegen verschiedene ENA-Fraktionen

Die Auswertung wurde wie folgt vorgenommen:
Seren, die nur mit unbehandeltem, nicht aber mit RNAse-behandeltem ENA präzipitieren, enthalten Ak gegen RNP (Abb. 4a).
Seren, die sowohl mit unbehandeltem, als auch mit RNAse-behandeltem ENA eine Präzipitatlinie bilden, enthalten Ak gegen das "Sm"-Antigen (Abb. 4b).
Seren, die mit unbehandeltem ENA zwei Präzipitatlinien ausbilden, mit RNAse-vorbehandeltem ENA aber nur eine, enthalten Ak gegen RNP und "Sm" (Abb. 4c).
Die Auswertung ist in Abb. 4 a-c graphisch dargestellt.

Der Testansatz mit DNAse wurde durchgeführt, um RNP-und "Sm"-Ak von Ak gegen möglicherweise im ENA enthaltene DNA zu unterscheiden (126). Sowohl das RNP- als auch das Sm-Antigen (Ag) sind resistent gegen DNAse.



4a. RNP-Ak 4b. Sm-Ak 4c. RNP- und Sm-Ak

A = 50 µl unverdünntes Patientenserum
E = 50 µl unbehandeltes ENA
R = 50 µl RNAse-behandeltes ENA
D = 50 µl DNAse-behandeltes ENA

Abb. 4: Auswertung und Interpretation der Präzipitatlinien in der Immundoppeldiffusion

Bei Nachweis von Ak gegen RNP oder "Sm" im unverdünnten Serum folgt die Bestimmung der Titer in gleicher Weise wie oben ausgeführt in geometrischer Serumverdünnungsreihe unter Verwendung von RNAse-behandeltem ENA im zentralen Loch (Abb. 2).

IV. Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der ENA-Ak

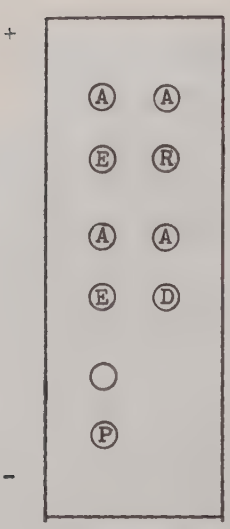
ENA-Ak lassen sich außer mit der Ouchterlony-Technik auch noch mit anderen Methoden nachweisen, so mit der Gegenstromimmunelektrophorese (19,61) und mittels der Hämagglutinationsmethode (3,29,114). Es wurde versucht, diese Methoden mit der hier verwendeten Immundoppeldiffusionstechnik nach Ouchterlony zu vergleichen.

1. Gegenstromimmunelektrophorese (CIE): Bei 17 Patienten wurden die ENA-Ak mittels der Gegenstromimmunelektrophorese (counter immune electrophoresis = CIE) in einer Modifikation der Methoden nach Kurata et al. (61) und nach Bresnihan et al. (19) nachgewiesen.

Gereinigte, entfettete und mit 1 %iger Agarose vorbeschichtete Objektträger wurden mit 3 ml 1 %iger Agarose in 0.025 M Barbitalpuffer beschichtet. In den erkalteten Agar wurden, in drei Abschnitte unterteilt, zehn Löcher von je 4 mm Durchmesser gestanzt: zwei Abschnitte mit je vier, der dritte mit je zwei einander gegenüberliegenden, je 5 mm voneinander entfernten Löchern (Abb. 5).

Die anodenwärts gelegenen Löcher eines jeden Abschnitts wurden mit je 20 µl Serum (A in Abb. 5), die der Kathode nähergelegenen mit je 20 µl ENA (Proteinkonzentration 10 mg/ml) (E), RNAse (R)- und DNAse (D)- behandeltem ENA bzw. im dritten Abschnitt mit Phenolblaulösung als marker (P) beschickt.

Die Elektrophorese wurde in Barbitalpuffer pH 8,6 (49,48 g Diäthylbarbitursäure, 3,08 g Kalziumlaktat, 42 ml 1N HCl, 0,4 g Natriumacid, aqua dest. ad 2 l , Verdünnung 1:2) für die Dauer von etwa 40 Minuten bei einer Stromstärke von 3,5 mA pro Objektträger durchgeführt. Sie wurde beendet, wenn der Phenolblaumarker 5 mm gewandert war und das gegenüberliegende Loch erreicht hatte. Die Präzipitatlinien wurden unmittelbar nach Beendigung der Elektrophorese und



A = 20 µl unverdünntes Patientenserum
E = 20 µl unbehandeltes ENA
R = 20 µl RNAse-behandeltes ENA
D = 20 µl DNAse-behandeltes ENA
P = 20 µl Phenolblaulösung (marker)

Abb. 5 : Bestimmung und Differenzierung der ENA-Ak mittels der CIE

nach 24 Stunden Inkubation in feuchter Kammer bei Zimmertemperatur mit der Lupe bei Beleuchtung von unten abgelesen.

2. Hämagglutinationsmethode: Zusätzlich konnten acht Patientenseren untersucht werden, die freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. G.H. Thoenes, Leiter des immunologischen Labors der Medizinischen Klinik Innenstadt (Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn) zur Verfügung gestellt wurden. Die Seren waren in seinem Labor mit der Hämagglutinationsmethode nach Sharp (114)et al. untersucht worden. In sämtlichen Fällen waren mit dieser Methode ENA-Ak in hohen Titern nachgewiesen worden. Diese Seren wurden nun zusätzlich mit der Immundiffusionstechnik getestet und die Ergebnisse beider Methoden miteinander verglichen.

ERGEBNISSE

A. EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

I. Screening: Häufigkeit von Antikörpern gegen ENA in ANA-positiven Seren

795 ausgewählte Seren mit antinukleären Ak in hohen Titern wurden in einem Screening-Programm mittels der oben angegebenen Immundoppeldiffusionsmethode nach Ouchterlony auf Ak gegen extrahierbare nukleäre Antigene untersucht. Die Seren stammten von 304 Patienten, darunter 244 Frauen (80,3 %) und 60 Männer (19,7 %). Bei den meisten Patienten waren die ANA zur Verlaufskontrolle über längere Zeiträume hinweg mehrfach bestimmt worden. Zwanzig Seren von gesunden Normalpersonen dienten als Kontrolle.

Ak gegen ENA konnten in 220 der 795 Seren (27,7 %) bzw. bei 90 der 304 Patienten (29,6 %) nachgewiesen werden. 575 Seren (72,3 %) bzw. 214 Patienten (70,4 %) zeigten kein Präzipitat gegen ENA (siehe Tabelle 1 und Abb. 6). Die Kontrollseren waren in allen Fällen negativ.

Tabelle 1: Häufigkeit von ENA-Ak bei Patienten mit hohen ANA-Titern (160)

		ENA-positiv	ENA-negativ
Seren	n	220	575
	%	27,7	72,3
Patienten	n	90	214
	%	29,6	70,4

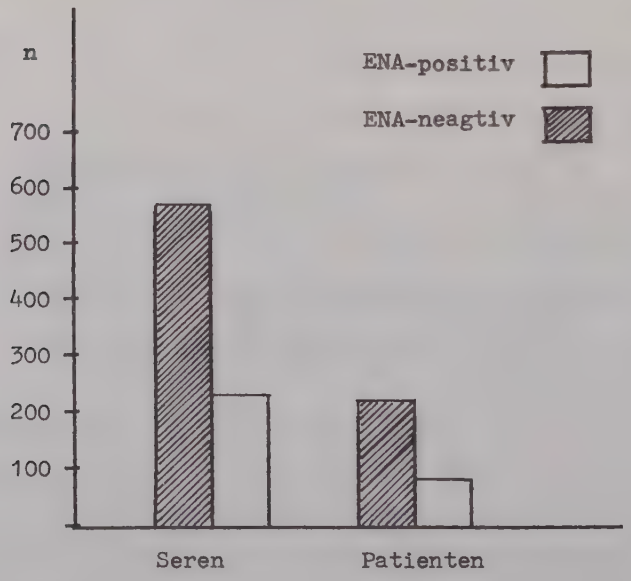


Abb. 6: Häufigkeit von ENA-Ak bei Patienten mit hohen ANA-Titern ($\geq$ 160)

II. Kernfluoreszenzmuster von ENA-positiven und ENA-negativen Seren

Im IIF-Test zeigten die Seren der 90 ENA-positiven Patienten folgende Kernbindungsmuster: 13 Patienten (14,4 %) hatten ein homogenes Fluoreszenzmuster, 73 Patienten (81,1 %) ein gefleckte ("speckled"), drei Patienten (3,3 %) ein nukleoläres und ein Patient (1,1 %) ein membranöses Muster (Tabelle 2). Bei drei Patienten fand sich abwechselnd ein homogenes und gefleckte Bindungsmuster; sie wurden jeweils zu der Gruppe gezählt, deren Muster überwog.

Bei den 214 ENA-negativen Patienten war in 93 Fällen (43,5 %) ein homogenes, in 79 (36,9 %) ein gefleckte, in 37 (17,3 %) ein nukleoläres und in fünf Fällen (2,3 %) ein membranöses ANA-Bindungsmuster nachweisbar (Tabelle 2).

Tabelle 2: Kernfluoreszenzmuster in Seren von ENA-positiven und ENA-negativen Patienten

Fluoreszenzmuster	ENA-positiv		ENA-negativ	
	n	%	n	%
gefleckt	73	81,1	79	36,9
homogen	13	14,4	93	43,5
nukleolär	3	3,3	37	17,3
membranös	1	1,1	5	2,3

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, besteht eine Korrelation zwischen dem Vorkommen von ENA-Ak und dem gefleckten Kernfluoreszenzmuster: 81 % der Seren von ENA-positiven Patienten boten im IIF-Test dieses Muster, welches nur in 37 % der Seren von ENA-negativen Patienten beobachtet wurde. Bei 73 der insgesamt 152 Patienten (42 %) mit geflecktem Fluoreszenzmuster und lediglich bei 12,3 % (13 von 106) der Patienten mit homogenem Bindungsmuster waren ENA-Ak nachweisbar. In ENA-negativen Seren fand sich das homogene Immunfluoreszenzmuster mit 43,5 % am häufigsten, während es bei ENA-positiven Patienten nur in 14,4 % vorkam.

III. ANA-Titer von ENA-positiven und ENA-negativen Seren

Um festzustellen, ob eine Beziehung zwischen dem Auftreten von Ak gegen ENA und der Höhe der ANA-Titer besteht, wurden die IIF-Titer von ENA-positiven und ENA-negativen Patienten miteinander verglichen (Tabelle 3 und 4).

Wie Tabelle 3 zeigt, korreliert das Vorkommen von ENA-Ak nicht nur mit dem Kernbindungsmuster, sondern auch mit der Höhe der ANA-Titer im IIF-Test. Bei gefleckten IIF-Muster lagen die ANA-Titer in ENA-positiven Seren deutlich höher (45 % >1280/ 33 % >2560) als in ENA-negativen Seren (17 % >1280/ 4 % >2560). Die ANA-Titer der ENA-positiven Patienten mit homogenem Muster lagen in 50 % über 1280, die der ENA-negativen Patienten nur in 17 %.

Tabelle 3: ANA-Titer mit gefleckтem Fluoreszenzmuster bei ENA-positiven und ENA-negativen Patienten

ANA-Titer (gefleckтes IIF-Muster)	ENA-positiv n	ENA-negativ n
1 : 40	1	3
1 : 80	2	12
1 : 160	7	12
1 : 320	8	12
1 : 640	4	11
1 : 1280	8	10
1 : 2560	7	9
1 : 5120	12	2
1 : 10240	4	1
1 : 20480	2	-

Tabelle 4: ANA-Titer mit homogenem, nukleolärem und membranösem Immunfluoreszenzmuster bei ENA-positiven und ENA-negativen Patienten

	Muster					
	homogen		nukleolär		membranös	
ANA-Titer	ENA + n	ENA - n	ENA + n	ENA - n	ENA + n	ENA - n
1 : 160	1	27	-	4	-	1
1 : 320	2	17	-	5	-	2
1 : 640	1	19	1	7	1	-
1 : 1280	1	12	1	9	-	-
1 : 2560	5	5	-	5	-	-
1 : 5120	-	4	-	2	-	-
1 : 10240	-	2	-	2	-	-
1 : 20480	-	4	1	2	-	-

In den wenigen ENA-positiven Seren mit nukleolärem und membranösem Immunfluoreszenzmuster war diese Korrelation zwischen ANA-Titer und dem Vorkommen von ENA-Ak nicht erkennbar (Tabelle 4).

Von 80 der 90 ENA-positiven Patienten stand genügend Serum für eine weitergehende Untersuchung zur Verfügung. Alle im folgenden genannten Prozentangaben beziehen sich daher auf 80 Patienten.

IV. Bestimmung der Titer von Ak gegen ENA

Durch Verdünnung der Seren mit 0,9 %iger Kochsalzlösung in geometrischer Reihe wurde bei 80 ENA-positiven Patienten der ENA-Titer mittels der Immundoppeldiffusion bestimmt.

Tabelle 5: ENA-Ak-Titer von 80 Patienten

ENA-Titer	Patienten n
1	16
2	15
4	12
8	13
16	6
32	6
64	4
128	2
256	5
512	1

Wie in Tabelle 5 dargestellt, waren ENA-Ak mit dieser Methode nur in relativ niedrigen Titern nachweisbar: nur in 30 % der Seren lagen die ENA-Ak-Titer über 8. Der höchste Titer wurde in einem Serum mit 512 gemessen. Der Vergleich mit den Ergebnissen des quantitativen IIF-Tests zeigte, daß keine Korrelation zwischen den ANA-Titern im IIF-Test und den ENA-Ak-Titern im Immundiffusionstest besteht.

V. Vorkommen und Häufigkeit von Antikörpern gegen den RNAse-empfindlichen und den RNAse-resistenten ENA-Anteil

Auch hier standen nur die Seren von 80 Patienten zur Verfügung. In 44 Fällen (55 %) war nach Behandlung der ENA-Präparation mit RNAse, wie oben beschrieben, kein Präzipitat mehr nachweisbar (Abb. 4a), die ENA-Ak waren bei diesen Patienten also gegen das RNAse-empfindliche RNP-Antigen gerichtet. In 18 Fällen (22,5 %) war die Präzipitatlinie auch nach enzymatischer Behandlung der ENA-Lösung noch sichtbar (Abb. 4b), d.h. es lagen Ak gegen das RNAse-resistente sogenannte "Sm"-Antigen vor. Bei weiteren 18 Patienten (22,5 %) waren bei Verwendung von unbehandeltem ENA zwei Präzipitatlinien, gegen RNAse-behandeltes ENA aber nur noch eine - die der Serum-Auftragungsstelle näher gelegene (61,97) - Linie zu beobachten (Abb. 4c). Bei diesen 18 Patienten lagen sowohl Ak gegen das RNAse-empfindliche RNP-Ag als auch gegen das RNA-se resistente 'Sm'-Ag vor (Tabelle 6).

Tabelle 6 : Serologische Untergruppen bei ENA-positiven Patienten

	Patienten n	Häufigkeit %
RNP-Ak (Antigen RNAse-empfindlich)	44	55,0
"Sm"-Ak (Antigen RNAse-resistent)	18	22,5
RNP- und "Sm"-Ak	18	22,5

Über die Hälfte der ENA-positiven Patienten (55 %) wiesen also Ak nur gegen die RNP-Fraktion des ENA auf, während in den übrigen Seren Ak mit Spezifität gegenüber dem "Sm"-Antigen (in 22,5 %) oder gegen "Sm" und RNP gleichzeitig (in 22,5 %) gefunden wurden (Tabelle 6). Insgesamt hatten also 62 Patienten (77,5 %) Ak gegen RNP und 36 Patienten (45 %) gegen "Sm".

VI . Vergleich verschiedener Bestimmungsmethoden zum Nachweis von ENA-Ak

1. Gegenstromimmunelektrophorese (CIE)

Bei 17 Patienten wurde die Bestimmung und Differenzierung der ENA-Ak zusätzlich mittels der Gegenstromimmunelektrophorese (CIE) durchgeführt.

In 16 Fällen (94 %) stimmte das Ergebnis mit dem des Ouchterlonytests überein. In einem Fall waren mittels der Immundiffusion zwei Präzipitatlinien festgestellt worden, deren eine gegen RNP gerichtet war. In der CIE zeigte sich jedoch in diesem Fall nur eine Linie.

Da mit der CIE im wesentlichen dieselben Ergebnisse wie mit der Immundiffusion nach Ouchterlony erzielt wurden, die CIE aber einen größeren technischen Aufwand erforderte, wurde sie nicht auf eine größere Anzahl Seren ausgedehnt.

2. Hämagglutinationsmethode

Acht ENA- bzw. RNP-positive Patientenseren aus dem Immunologischen Labor der Medizinischen Klinik Innenstadt, die nach der Hämagglutinationsmethode bestimmt worden waren, wurden uns freundlicherweise zum Vergleich dieser Methode mit der Ouchterlony-Technik überlassen. Zum Zeitpunkt der Durchführung des Immundiffusionstests waren die Ergebnisse der Hämagglutinationsmethode noch nicht bekannt.

Ak gegen das RNP-Antigen wurden in allen acht Fällen auch mit der Ouchterlony-Technik entdeckt. Antikörper gegen das 'Sm'-Antigen hingegen waren mittels des Hämagglutinationstests bei zwei Patienten nachgewiesen worden (Titer 1:320 und 1:40), mit der Immundiffusion jedoch nur bei dem Patienten mit dem höheren 'Sm'-Ak-Titer im Hämagglutinationstest. Insgesamt lagen der Methode entsprechend die Ak-Titer im Hämagglutinationstest wesentlich höher und sie korrelierten nicht mit den Ak-Titern im Ouchterlony-Test. Die höchsten Titer wurden aber mit beiden Methoden bei der gleichen Patientin festgestellt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Vergleich unterschiedlicher Bestimmungsmethoden (Hämagglutination/Immundiffusion) zum Nachweis von Ak gegen RNP und Sm

Patient	Hämagglutination		Immundiffusion	
	RNP-Titer	Sm-Titer	RNP-Titer	Sm-Titer
D.	1: 1280	-	32	-
A.	1:325680	-	512	-
J.	1: 640	1: 40	2	-
I.	1: 20480	-	1	-
M.	1: 320	1:320	4	1
P.	1: 40960	-	8	-
E.	1: 1280	-	4	-
S.	1: 40960	-	8	-

Die Hämagglutinationsmethode scheint also empfindlicher zu sein als der Immundiffusionstest nach Ouchterlony. Allerdings können mit letzterem gleichzeitig mehrere Ak-Systeme entdeckt werden (113). und er ist technisch weniger aufwendig, weniger störanfällig und somit für Routineuntersuchungen im klinischen Labor geeigneter (60,113).

B. KLINISCHE UNTERSUCHUNG

I. Geschlechts- und Altersverteilung der ENA-positiven Patienten

Die untersuchte Patientengruppe setzte sich aus 244 Frauen und 60 Männern zusammen. 86,7 % der Patienten mit ENA-Ak waren Frauen, 13,3 % waren Männer. Die Geschlechts- und Altersverteilung der untersuchten Patienten ist in den Tabellen 8 und 9 dargestellt.

In der Geschlechtsverteilung bestand kein wesentlicher Unterschied zwischen dem Gesamtkollektiv, den ENA-positiven und den ENA-negativen Patienten. In allen Gruppen waren die weiblichen Patienten in der Überzahl, in der ENA-positiven Gruppe waren sie noch etwas häufiger vertreten als in der ENA-negativen Gruppe (Tabelle 8).

Die Altersverteilung der ENA-negativen Gruppe wurde nicht untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten mit ENA-Ak lag bei 40,7 Jahren. Weibliche Patienten waren durchschnittlich um zehn Jahre jünger als männliche (Tabelle 9).

ENA-Ak konnten also am häufigsten bei weiblichen Patienten im mittleren Lebensalter nachgewiesen werden.

Tabelle 8: Geschlechtsverteilung

	Gesamtkollektiv		ENA-positive Patienten		ENA-negative Patienten	
	n	%	n	%	n	%
Frauen	244	80,3	78	86,7	166	77,6
Männer	60	19,7	12	13,3	48	22,4

Tabelle 9: Altersverteilung der ENA-positiven Patientengruppe
(von acht Patienten war das Alter nicht bekannt)

Gesamtgruppe	14 - 78 Jahre	Durchschnittsalter:	40,7 Jahre
Frauen	14 - 74 Jahre	Durchschnittsalter:	39,4 Jahre
Männer	29 - 78 Jahre	Durchschnittsalter:	50,3 Jahre

II. Vorkommen von ENA-Ak bei verschiedenen Kollagenosen

Von den insgesamt 304 Patienten, deren Seren untersucht worden waren, konnte bei 171 die Diagnose durch klinische Befunde ausreichend gesichert werden.

Die Diagnose SLE wurde nach den vorläufigen Kriterien der American Rheumatism Association (ARA) zur Diagnostik des systemischen LE gestellt, von denen mindestens vier erfüllt sein mußten (25).

Die Diagnose CDLE wurde aufgrund des klinischen Bildes (discoide oder disseminierte Hautveränderungen), des histologischen Befundes und des Befundes im direkten Immunfluoreszenz (DIF)-Test gesichert. Bei einigen Patienten lagen ausgedehnte LE-Hautveränderungen im Sinne eines LE integumentalis disseminatus (58) vor, der in der amerikanischen Literatur als LE subacutus klassifiziert wird (92,120).

Die Gruppe der Patienten mit der Diagnose PSS umfaßte sowohl Fälle mit Akrosklerodermie als auch solche mit Sklerodermie von proximal aszendierenden Typ und solche mit Stammsklerodermie.

Eine Dermatomyositis wurde anhand des klinischen Bildes und der biochemischen Parameter (CK, LDH) festgelegt.

Die Verdachtsdiagnose Sharp-Syndrom wurde bei den Patienten gestellt, die mindestens je zwei typische Symptome von zwei verschiedenen Kollagenosen (SLE, PSS, DM) aufwiesen (23).

Das Gesamtkollektiv von 171 ANA-positiven Patienten mit gesicherter Diagnose setzte sich aus 30 Patienten mit SLE, 47 mit CDLE, 73 mit PSS, zehn mit DM und fünf mit MCTD zusammen. Von den 30 SLE-Patienten hatten 14 (47 %), von den 47 CDLE-Patienten 15 (32 %), von den 73 PSS-Patienten 20 (27 %), von den zehn DM-Fällen einer (10 %) und von den fünf MCTD-Patienten alle (100 %) Antikörper gegen ENA (Tabelle 10).

Bei weiteren sechs ENA-positiven Patienten, die nicht in Tabelle 10 aufgeführt sind, bestand in je zwei Fällen ein Sjögren-Syndrom bzw. eine Vaskulitis, in einem Fall eine Raynaud'sche Krankheit ohne nachweisbare Kollagenose und bei einer Patientin mit multiplen rezidivierenden Aphten der Verdacht auf M. Behçet.

Tabelle 10: Häufigkeit von ENA-Ak bei verschiedenen Kollagenosen

Diagnose	Patienten n	ENA-positive Patienten n	(%)
Gesamtzahl	171	61 *	
SLE	30	14	(47)
CDLE	47	15	(32)
PSS	73	20	(27)
DM	10	1	(10)
MCTD	5	5	(100)

* Bei 11 der insgesamt 80 ENA-positiven Seren war die Diagnose bzw. die Überweisungsdiagnose nicht bekannt, in acht weiteren Fällen fehlten ausreichende klinische Daten für eine Sicherung der Diagnose.

Tabelle 11 zeigt, daß bei insgesamt 50 Patienten Ak gegen die RNAse-empfindliche ENA-Fraktion, das RNP-Antigen, nachweisbar waren. Bei 34 Patienten wurden ausschließlich RNP-Ak, bei 16 Patienten zusätzlich Ak gegen das RNAse-resistente sogenannte "Sm"-Ag festgestellt. Im Serum von 11 Patienten fanden sich Ak, die gegen RNAse-resistente Kernantigene ("Sm") allein gerichtet waren.

Vorkommen von RNP-Ak bei verschiedenen Kollagenosen

Von den 34 Patienten mit RNP-Ak hatten fünf ein Sharp-Syndrom, bei je sechs lag ein SLE oder CDLE, bei 13 eine PSS und bei einer Patientin eine DM vor. Außerdem wurden RNP-Ak bei je einer Patientin mit Sjögren-Syndrom, mit Vaskulitis und mit Verdacht auf M. Behçet nachgewiesen (Tabelle 11).

In den 16 Fällen mit gleichzeitigem Vorkommen von RNP- und "Sm"-Ak konnte bei vier Patienten die Diagnose SLE gesichert werden, bei vier lag ein CDLE und bei fünf eine PSS vor. Je eine Patientin dieser Gruppe war an einem Sjögren-Syndrom, einer Vaskulitis bzw. einem M. Raynaud erkrankt (Tabelle 11).

Von den elf Patienten mit Ak gegen den RNAse-resistenten ENA-Anteil wurden in vier Fällen ein SLE, in fünf ein CDLE und in zwei eine PSS diagnostiziert (Tabelle 11).

Tabelle 11: Vorkommen von Ak gegen RNP, Sm oder RNP und Sm bei verschiedenen Kollagenosen

Diagnose	ANA	ENA-Ak n	ENA-Ak %	RNP-Ak n	RNP-Ak %	'Sm'-Ak n	'Sm'-Ak %	RNP+'Sm'-Ak n	RNP+'Sm'-Ak %
Gesamtzahl	171	61		34		11		16	
SLE	30	14	47	6	20	4	13	4	13
CDLE	47	15	32	6	13*	5	11*	4	9*
PSS	73	20	27	13	18	2	3	5	7
DM	10	1	10	1	10	-	-	-	-
MCTD	5	5	100	5	100	-	-	-	-
Sjögren **		2		1		-		1	
Vaskulitis		2		1		-		1	
M.Raynaud		1		-		-		1	
V.a.M.Behçet		1		1		-		-	

*RNP-Ak: alle 6 CDLE-Patienten waren als LE superficialis disseminatus klassifiziert.

*'Sm'-Ak: 3 der 5 CDLE-Patienten waren als LE superficialis klassifiziert.

*RNP+'Sm'-Ak: einer der 4 CDLE-Patienten war als LE superficialis disseminatus klassifiziert.

**Die Gesamtzahl der Patienten mit diesen Diagnosen innerhalb des Kollektivs von 304 Patienten konnte retrospektiv nicht ermittelt werden.

III. Klinische Befunde und Laborbefunde bei Patienten mit anti-RNP-Ak

Um zu überprüfen, ob die serologischen Merkmale anti-RNP, anti-'Sm' und anti-RNP + anti-'Sm' bei Patienten mit Kollagenosen bestimmten klinischen Befunden zuzuordnen sind, wurde die Häufigkeit bestimmter Symptome bei den drei serologischen Gruppen untersucht.

1. Klinische Befunde

Leitsymptome der Patienten mit RNP-Ak waren, wie Tabelle 12 zeigt, akrale Durchblutungsstörungen: ein typisches Raynaud-Syndrom, Akrozyanose oder Schwellungen der Finger und Hände. Beinahe ebenso häufig traten LE-Hauterscheinungen auf, mit chronisch-discoiden oder disseminierten schuppenden Herden oder dem typischen Schmetterlingserythem. Bei fast der Hälfte (45 %) der Patienten mit RNP-Ak waren kutane Sklerodermiesymptome festzustellen: Sklerosierung der Haut, Fingerkuppennekrosen und Mikrostomie. Bei 35 - 40 % der Patienten wurde mit radiologischen und funktionsdiagnostischen Methoden eine systemische Beteiligung von Lunge und Ösophagus in der für die PSS typischen Form nachgewiesen. Bei etwa 35 % der Patienten lag eine Arthropathie oder Myopathie vor, ebensoviele klagten über Parästhesien.

In der Patientengruppe mit "Sm"-Ak bestanden auffallend häufig Hinweise auf eine Nierenbeteiligung (erhöhtes Kreatinin, eingeschränkte Kreatininclearance, Proteinurie). Das weitaus häufigste Symptom in dieser Gruppe waren LE-Hauterscheinungen, was aufgrund des Überwiegens von Patienten mit SLE und CDLE in dieser Gruppe zu erwarten gewesen war (Tabelle 12).

Bei Patienten mit gemeinsamem Vorkommen von RNP- und "Sm"-Ak waren ebenfalls LE-Hauterscheinungen, periphere Durchblutungsstörungen und Arthralgien überproportional häufig vertreten (Tabelle 12).

Die prozentuale Verteilung der häufigsten Symptome innerhalb der einzelnen Gruppen ist in Abb.7 graphisch noch einmal dargestellt.

2. Laborbefunde

In Tabelle 13 sind die wichtigsten humoralen Entzündungsparameter zusammengestellt, die in diesen drei Gruppen bestimmt wurden. Hier konnten nur geringe Unterschiede zwischen Patienten mit RNP- , "Sm"- und RNP-+"Sm"-Ak festgestellt werden. Blutkörperchensenkungsbeschleunigung, Hypergammaglobulinämie und positive Rheumafaktoren waren die führenden Befunde.

Die prozentuale Häufigkeit dieser Befunde ist in Abb. 8 dargestellt.

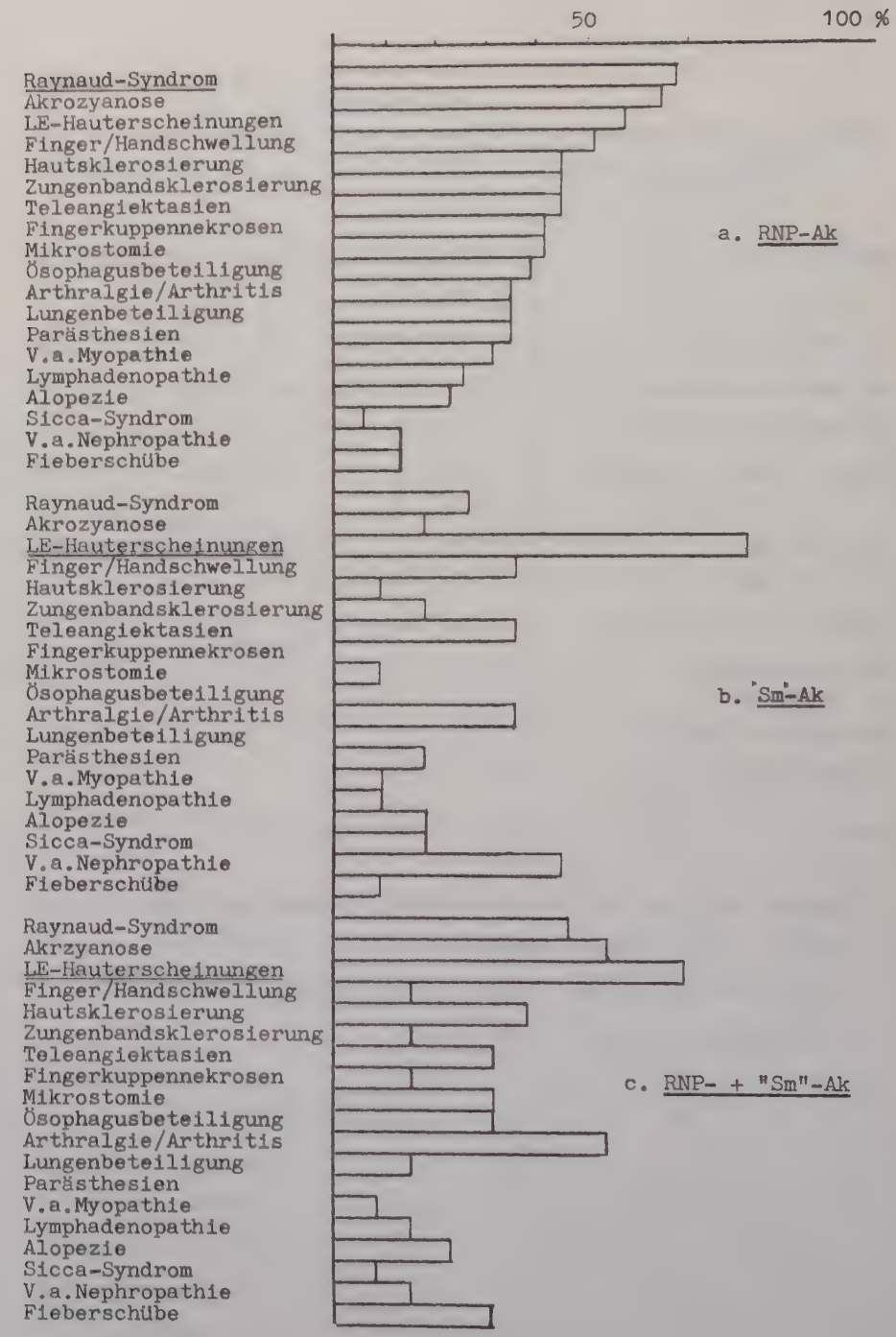
Tabelle 12: Klinische Befunde bei Patienten mit Ak gegen RNP ,"Sm" und RNP + "Sm"

Symptome	RNP-Ak n=31*	%	"Sm"-Ak n=11	%	RNP+"Sm"-Ak n=13*	%
Raynaud-Syndrom	21	68	3	27	6	46
Akrozyanose	20	65	2	18	7	54
Hand-/Fingerschwellungen	16	52	4	36	2	15
LE-Hauterscheinungen	18	58	9	82	9	69
Arthalgie/Arthritis	11	35	4	36	7	54
V.a. Nephropathie	4	13	5	45	2	15
-Kreatinin > 1,2 mg/100 ml	5	16	5	45	-	-
- ↓ Kreatinin-Clearance	2	6	1	9	2	15
- Proteinurie	2	6	1	9	1	8
- bioptisch gesichert	1	3	-	-	-	-
Parästhesien	11	35	2	18	-	-
Lymphadenopathie	8	26	1	9	2	15
Alopezie	7	23	2	18	3	23
Fieberschübe	4	13	1	9	4	31
Serositis	3	10	2	18	-	-
Sklerosierung der Haut	14	45	1	9	5	38
Fingerkuppennekrosen	13	42	-	-	2	15
Zungenbandsklerose	14	45	2	18	2	15
Mikrostomie	13	42	1	9	4	31
Teleangiektasien	14	45	4	36	4	31
Ösophagusmotilitätsstörung	12	39	-	-	4	31
Lungenbeteiligung	11	35	-	-	2	15
Dyspigmentierungen	5	16	3	27	5	38
Calcinose	4	13	1	9	1	8
Sicca-Syndrom	2	6	2	18	1	8
V.a.Myopathie	10	32	1	9	1	8

Tabelle 13: Laborbefunde bei Patienten mit Ak gegen RNP, "Sm" und RNP + "Sm"

Laborbefunde	RNP-Ak n	RNP-Ak %	"Sm"-Ak n	"Sm"-Ak %	RNP+"Sm"-Ak n	RNP+"Sm"-Ak %
BKS-Beschleunigung	26/28	93	9/10	90	10/13	77
Hypergammaglobulinämie	15/27	56	5/10	50	9/12	75
DNA-Ak signifikant erhöht	7/25	28	3/10	30	2/12	17
grenzwertig	2/25	8	-	-	2/12	17
Leukozytopenie ($< 4000/mm^3$)	7/27	26	4/10	40	5/13	38
Anämie (Hb < 12 g/100 ml)	6/28	21	3/10	30	4/13	31
Thrombozytopenie ($< 100000/mm^3$)	2/26	8	1/10	10	1/13	8
Rheumafaktor positiv	11/20	55	5/ 8	63	8/11	73
LE-Faktor positiv	5/15	33	0/ 5	-	2/ 7	29

*Symptome und Laborbefunde der sechs Patienten mit Sjögren-Syndrom, Vaskulitis, M. Raynaud und V.a.M.Behçet sind in den Tabellen 12 und 13 und in den Abbildungen 7 und 8 nicht berücksichtigt.


50
100 %
Raynaud-Syndrom
Akrozyanose
LE-Hauterscheinungen
Finger/Handschwellung
Hautsklerosierung
Zungenbandsklerosierung
Teleangiektasien
Fingerkuppennekrosen
Mikrostomie
Ösophagusbeteiligung
Arthralgie/Arthritis
Lungenbeteiligung
Parästhesien
V.a.Myopathie
Lymphadenopathie
Alopezie
Sicca-Syndrom
V.a.Nephropathie
Fieberschübe
a. RNP-Ak
Raynaud-Syndrom
Akrozyanose
LE-Hauterscheinungen
Finger/Handschwellung
Hautsklerosierung
Zungenbandsklerosierung
Teleangiektasien
Fingerkuppennekrosen
Mikrostomie
Ösophagusbeteiligung
Arthralgie/Arthritis
Lungenbeteiligung
Parästhesien
V.a.Myopathie
Lymphadenopathie
Alopezie
Sicca-Syndrom
V.a.Nephropathie
Fieberschübe
b. "Sm"-Ak
Raynaud-Syndrom
Akrzyanose
LE-Hauterscheinungen
Finger/Handschwellung
Hautsklerosierung
Zungenbandsklerosierung
Teleangiektasien
Fingerkuppennekrosen
Mikrostomie
Ösophagusbeteiligung
Arthralgie/Arthritis
Lungenbeteiligung
Parästhesien
V.a.Myopathie
Lymphadenopathie
Alopezie
Sicca-Syndrom
V.a.Nephropathie
Fieberschübe
c. RNP- + "Sm"-Ak

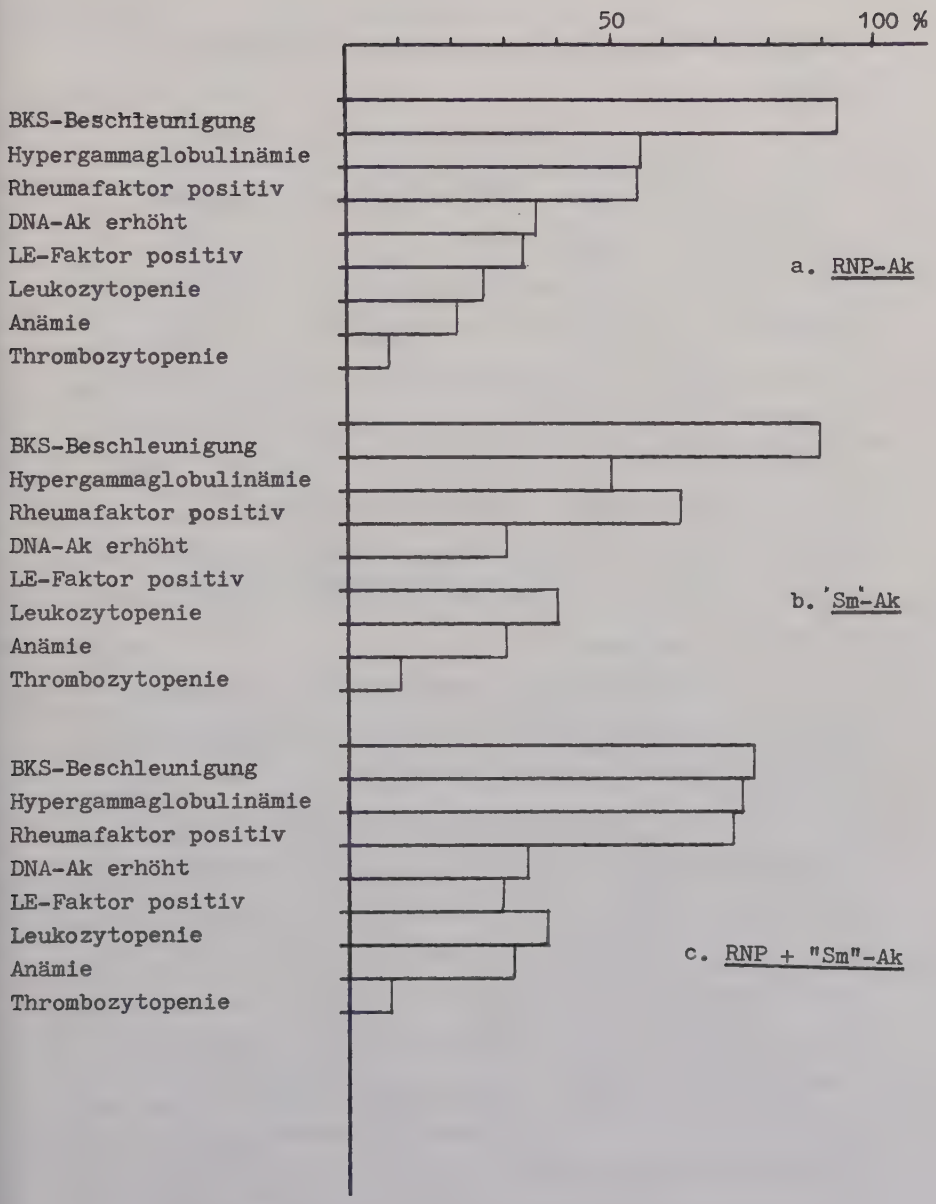


Abb.8: Laborbefunde bei Patienten mit Ak gegen RNP, "Sm" und RNP + "Sm"

IV. Klinische Befunde und Laborbefunde bei Patienten mit MCTD

Zum Abschluß sollen die fünf Patienten mit der klinischen Diagnose MCTD noch einer gesonderten Betrachtung unterzogen werden.

Alle Patienten zeigten ein Mischsyndrom mit Symptomen des SLE (Arthralgien,Arthritiden, LE-Hauterscheinungen wie Wangenerythem oder discoide Läsionen, Lymphadenopathie, Parästhesien, Alopezie), der systemischen Sklerodermie (Raynaud-Syndrom, Akrozyanose, Hand- und Fingerschwellungen, Ösophagusmotilitätsstörungen, sklerodermiforme Hautveränderungen, Zungenbandsklerosierung, Mikrostomie) oder der Dermatomyositis (livide Erytheme, Myopathie).

Es handelte sich ausschließlich um weibliche Patienten im Alter zwischen 23 und 59 Jahren bei einem Durchschnittsalter von 42,6 Jahren (Tabelle 14).
Bei allen lagen hohe ANA-Titer mit gefleckтem Kernfluoreszenzmuster im IIF-Test (1:5120 bis 1:20480) und ENA-Ak im Immundiffusionstest vor. Stets waren die Ak gegen die RNP-Fraktion des ENA gerichtet. In der direkten Immunfluoreszenz (DIF) wurde bei allen Patienten eine epidermale Kernfluoreszenz festgestellt (Tabelle 14)(41,43,94). Dagegen war der sogenannte Lupus Bandtest (LBT) , die immunfluoreszenzoptisch nachgewiesene Immunglobulinablagerung an der Basalmembran in klinisch gesunder Haut, nur in einem Fall positiv. Die übrigen Laborparameter unterschieden sich

Tabelle 14: Laborbefunde bei Patienten mit MCTD

Patient	Alter (Jahre) *	ANA-Titer (gefleckt Muster)	ENA-Ak-Titer	RNP-Ak
A.	32	5120	512	+
B.	59	20480	2	+
D.	44	20480	32	+
K.	23	20480	64	+
M.	55	10240	128	+

* Durchschnittsalter 42,6 Jahre

Tabelle 15: Klinische Befunde bei Patienten mit MCTD

Symptome	n	Symptome	n
Raynaud-Syndrom	5	Parästhesien	2
Akrozyanose	5	diffuse Alopezie	2
Arthralgien/Arthritis	5	Fieber	2
periorbitale livide Erytheme	5	Zungenbandsklerose	2
Hand-/Fingerschwellungen	4	Mikrostomie	1
Autoimmunthyreoiditis	3	Fingerkuppennekrose	1
Myopathie	3	Sweet-Syndrom	1
LE-Hauterscheinungen	3	Lungenbeteiligung	-
Ösophagusmotilitätsstörungen	3	Nierenbeteiligung	-
Lymphadenopathie	3		
Teleangiektasien	3		
Sklerosierung der Haut	2		
Sicca-Syndrom	2		

nicht von denen der Patienten mit RNP-Ak: BKS-Beschleunigung, Hypergammaglobulinämie und positive Rheumafaktoren waren am häufigsten nachweisbar.

Die klinischen Symptome der MCTD-Patienten sind in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit in Tabelle 15 aufgeführt. Bei allen Patienten waren Raynaud-Syndrom, Akrozyanose und Arthralgien bzw. Arthritiden festgestellt worden, bei vier eine diffuse Schwellung der Hände und Finger, bei je drei waren Myositis und LE-Hauterscheinungen beobachtet worden. In drei Fällen wurden Ösophagusmotilitätsstörungen nachgewiesen ohne daß Dysphagie-Beschwerden bestanden. Lungenfunktionsstörungen konnten hingegen bei keiner der MCTD-Patientinnen festgestellt werden. Bei zwei Patientinnen trat ein Sicca-Syndrom auf. In allen fünf Fällen wurden periorbitale livide, an DM erinnernde Erytheme beobachtet. Dieser Befund war bei anderen ENA-positiven Patienten nicht erhoben worden. Weiter fiel auf, daß drei Patientinnen Ak gegen Thyreoglobulin und Mikrosomen, also eine Autoimmunthyreoiditis (Hashimoto) aufwiesen. Bei einer Patientin trat eine Purpura an den Beinen auf, bei einer anderen ein Sweet-Syndrom mit hohem Fieber, Leukozytenanstieg und histologischen und immunhistologischen Zeichen einer leukozytoklastischen Immunkomplexvaskulitis und zusätzlich ein Erythema exsudativum multiforme.
In keinem Fall bestanden Hinweise auf eine Nierenbeteiligung, ebenso war keine Serositis nachweisbar.

DISKUSSION

1. Untersuchungsmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden 795 Seren von 304 Patienten auf präzipitierende Ak gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA) untersucht. Grundlage für die Auswahl der Seren war der Nachweis hoher ANA-Titer im IIF-Test. Die Seren stammten entweder von Patienten der Dermatologischen Universitätsklinik München oder waren zur Bestimmung der ANA von auswärtigen Kliniken oder niedergelassenen Dermatologen eingesandt worden.

Bei 171 der 304 Patienten konnte aufgrund der klinischen und laborchemischen Befunde die Diagnose retrospektiv gesichert werden: bei 30 Patienten bestand ein LE mit systemischer Beteiligung (SLE), bei 47 ein kutaner LE mit discoiden oder disseminierten LE-Hauterscheinungen, bei 73 eine progressive systemische Sklerodermie (PSS) und bei 10 Patienten eine Dermatomyositis. Fünf Patienten boten das klinische Bild einer MCTD mit der von Sharp et al. (114) beschriebenen Mischsymptomatik. Bei allen Patienten standen Hautveränderungen im Vordergrund, so daß z.B. schwere Verlaufsformen des SLE mit Nieren- und ZNS- Beteiligung und Polyserositis nur in niedrigen Fallzahlen vertreten sind. Aufgrund dieses ausschließlich dermatologischen Krankenguts unterscheidet sich die vorliegende Arbeit von anderen, vorwiegend in der englischsprachigen Literatur publizierten Untersuchungen, die meist mit Patienten aus medizinischen Kliniken oder rheumatologischen Zentren durchgeführt wurden.

2. Methode

Als Antigensubstrat zum Nachweis der präzipitierenden ENA-Ak diente ein Kaninchenthymusextrakt, der heute weltweit als ENA-Reagenz - meist von der gleichen Bezugsquelle - verwendet wird.

Drei Nachweismethoden sind heute gebräuchlich:

1. der von Sharp et al. angegebene Hämagglutinationstest mit ENA-beschichteten Schafserythrozyten (112,114),
2. Die von Kurata und Tan (61) sowie Bresnihan et al. (19) beschriebene Gegenstromimmunelektrophorese (CIE) und
3. die von Tan und Kunkel (126) zum Nachweis von ENA-Ak erstmals eingesetzte Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony (84). Davon wurde die letztere gewählt, vor allem, weil sie die Möglichkeit bietet, gleichzeitig mehrere präzipitierende Ak nachweisen zu können (113). Diese Methode ist auch besonders zum Nachweis von RNP-Ak geeignet (29). Die Hämagglutinationsmethode ist zwar sensitiver (29,60,113), aber wesentlich aufwendiger und hat zudem den Nachteil, auch Ak gegen zytoplasmatisches RNP zu erfassen (76).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine begrenzte Zahl von Seren mit allen drei Bestimmunsmethoden untersucht. Wie Tabelle 7 zeigt, konnten mit der Immundiffusion und der Hämagglutination in fast allen Fällen übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden. Nur bei einem Serum mit niedrigem Ak-Titer von 1:40 in der Hämagglutination fiel der Ouchterlonytest negativ aus. was die geringere Sensitivität der gewählten Methode bei niedrigen Hämagglutinationstitern (unter 160) bestätigt (60).

Im Gegensatz zu den Angaben von Kurata und Tan (61) erwies sich die aufwendigere CIE-Methode in der vorliegenden Untersuchung als nicht empfindlicher (S. 25), so daß sie keine wesentlichen Vorteile gegenüber der Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony zu bieten scheint.

3. Ergebnisse

In 220 von 795 ANA-positiven Seren (28 %) bzw. bei 90 von 304 Patienten (30 %) konnten präzipitierende Ak gegen ENA nachgewiesen werden.

Northway und Tan (82) fanden mittels Immundiffusion bei 27 von 147 Patienten (18 %) mit Kollagenosen und ANA vom gefleckten Kernbindungsmuster, Notman et al. (83) im Hämagglutinationstest bei 50 von 183 Patienten (27 %) Ak gegen ENA. In der multizentrischen Studie von Sharp et al. (113), in welcher Seren von 272 Patienten mit verschiedenen rheumatischen Erkrankungen untersucht wurden, konnten bei 127 Patienten (47 %) mit der Hämagglutinationsmethode ENA-Ak nachgewiesen werden, wovon 91 % (116 Patienten) auch in der Immundiffusion ENA-positiv waren. Diese Seren wiesen alle entweder ein geflecktes Kernbindungsmuster auf oder stammten von Patienten mit einer Mischkollagenose. Berücksichtigt man in dem vorliegenden Krankengut ebenfalls nur die 152 Patienten mit geflecktem ANA-Bindungsmuster im IIF-Test, bei denen in 42 % ENA-Ak auftraten, so läßt sich trotz der geringeren Sensitivität der Immundiffusionstechnik eine gute Übereinstimmung mit dem Ergebnis von Sharp et al. (113) feststellen. Bresnihan et al. (19) wiesen

mittels der CIE bei 22 % ihrer Patienten mit Kollagenosen ENA-Ak nach; bei Kurata und Tan (61) waren 44 % eines ähnlichen Patientenkollektivs mit derselben Technik ENA-positiv. Zusammengefaßt zeigen die eigenen Ergebnisse und diejenigen aus der Literatur, daß - abhängig von der Methode und der Zusammensetzung des Krankengutes - 20-50 % der ANA-positiven Patienten mit Kollagenosen ENA-Ak aufweisen.

Northway und Tan (82) hatten 1972 erstmals festgestellt, daß Seren, die Ak gegen ENA enthalten, im IIF-Test vor allem ein gefleckte ("speckled") Kernbindungsmuster erzeugen. Dies konnte in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden: über 80 % der ENA-positiven Seren zeigten ein gefleckte Immunfluoreszenzmuster, während bei den ENA-negativen Seren das homogene Muster mit 44 % am häufigsten war (Tabelle 2).

Wie in den Tabellen 3 und 4 dargestellt, besteht nicht nur eine Korrelation zwischen dem Vorkommen von ENA-Ak und dem ANA-Bindungsmuster im IIF-Test, sondern auch zwischen dem von ENA-Ak und ANA-Titern. In Seren mit hohen ANA-Titern sind häufiger ENA-Ak nachweisbar als in Seren mit niedrigen ANA-Titern, besonders dann, wenn ein gefleckte Immunfluoreszenzmuster vorliegt. Ähnliche Ergebnisse werden auch von anderen Untersuchern berichtet (23,104,111, 113,114,127).

Bei 30 Patienten konnten Verlaufskontrollen mit Seren durchgeführt werden, die teilweise über einen Zeitraum von mehreren Jahren hinweg gewonnen worden waren. Diese Verlaufskontrollen ergaben, daß bei ein und demselben Patienten Titerschwankungen der ENA-Ak innerhalb

enger Grenzen (meist nur ein bis drei Titerstufen) möglich sind und daß Seren mit niedrigen ENA-Ak-Titern gelegentlich negativ werden können. Bei der Mehrzahl der Patienten jedoch blieben die ENA-Ak-Titer konstant, was auch von anderen Untersuchern (111,114), gerade bei Patienten mit MCTD und hohen ENA-Ak-Titern, beobachtet wurde.
Bei einigen Patienten mit MCTD wurde bei klinischer Exacerbation ein Abfallen der ENA-Ak-Titer beschrieben, was möglicherweise auf der Bildung von Immunkomplexen beruht (114).

Im Rahmen der hier durchgeführten Verlaufskontrollen war keine Korrelation zwischen der Titerhöhe der ENA-Ak und der Krankheitsaktivität festzustellen. Anders als die anti-DNA-Ak-Titer bei SLE (27,39,51,52,55,64,83,89,104,127) sind daher die Titer der anti-ENA-Ak offenbar nicht als serologische Aktivitätsparameter bei Kollagenosen geeignet.

Durch RNAse-Vorbehandlung des Kaninchenthymusextraktes können mit der Ouchterlony-Methode hauptsächlich zwei Ak-Gruppen nachgewiesen werden : 1. Ak gegen die RNAse-empfindliche ENA-Fraktion und 2. Ak gegen den RNAse-resistenten ENA-Anteil. Nach übereinstimmenden Angaben in der Literatur (67,69,82,114,115) sind Ak gegen die RNAse-empfindliche ENA-Fraktion ausschließlich gegen nukleäres RNP gerichtet. Sowohl der RNA-Anteil als auch der Proteinanteil des RNP-Moleküls sind für die Aktivität des RNP-Antigens nötig (30). Im Gegensatz dazu sind heute mehrere Ak bekannt, die mit der RNAse-resistenten Fraktion des ENA präzipitieren : Von Tan und Kunkel (126) wurde bereits 1965 im Serum eines Patienten mit SLE ein Ak entdeckt, der mit RNAse-resistentem ENA reagiert. Dieser wurde nach dem Namen des Patienten (Smith) als "Sm"-Ak bezeichnet und

konnte in späteren Untersuchungen auch bei anderen Patienten mit SLE nachgewiesen werden (83,124,127), allerdings nur mit einer Häufigkeit von 20-40 % . Auch hat sich gezeigt, daß Ak gegen das "Sm"-Antigen häufig in Kombination mit Ak gegen weitere ENA-Fraktionen - vor allem mit RNP-Ak - auftreten (44,60,96). Die diagnostische Bedeutung des "Sm"-Ak als sogenannter "marker antibody" für SLE ist dadurch wesentlich eingeschränkt.

Neuere Untersuchungen, besonders die von Akizuki (2), haben ergeben, daß der RNAse-resistente ENA-Anteil neben dem "Sm"-Antigen auch das nukleäre Antigen Ha enthält, das mit Ak in Seren von Patienten mit Sjögren-Syndrom und SLE präzipitiert. Dieses Antigen ist immunologisch identisch (6) mit dem 1975/76 von Alspaugh und Tan (7,8) beschriebenen SS-B-Antigen und dem ursprünglich im Zytoplasma vermuteten, von Mattioli und Reichlin 1974 entdeckten RNA-Proteinkomplex La (68), der möglicherweise doch überwiegend im Zellkern lokalisiert ist (124). Antikörper gegen diese immunologisch identischen Antigene finden sich in etwa 60 % bei Patienten mit der Sicca-Form des Sjögren-Syndroms (7,8) und bei 25-30 % der SLE-Patienten (5,91), hauptsächlich bei solchen mit Sicca-Symptomatik. Der routinemäßig durchgeführte IIF-Test zum Nachweis antinukleärer Ak fällt bei diesen Patienten häufig negativ aus (68,90).

Von Tan et al. (129) wurde bereits 1975 ein neuer Ak beschrieben, der ebenfalls gegen eine RNAse-resistente ENA-Fraktion, das sogenannte Scl-70-Antigen, gerichtet ist. Dieser Ak soll bei etwa 20 % der Patienten mit PSS vorkommen. Weitere klinische Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen über die Häufigkeit dieses Scl-70-Ak bei Sklerodermie oder anderen Kollagenosen liegen allerdings nicht vor.

Die verschiedenen, mit der RNAse-resistenten ENA-Fraktion reagierenden Ak können durch weitere Vorbehandlung des ENA-Gemischs z.B. mit Trypsin, Pronase oder durch Erhitzen bei 37 Grad C bzw. bei 56 Grad C voneinander

unterschieden werden (2,5,68,96). Allerdings sind die Angaben in der Literatur über diese biochemische Differenzierung nicht einheitlich, so daß eine eindeutige Charakterisierung der verschiedenen Ak im Immundiffusionstest nur durch Verwendung von standardisierten Referenzseren möglich ist, die zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Untersuchung noch nicht zur Verfügung standen. Bei der Auswertung der Ergebnisse interessierte daher vor allem, ob die RNP-Ak, die auch in einem Routinelabor eindeutig und reproduzierbar nachgewiesen werden können, eine diagnostische Bedeutung für Kollagenosen haben. Die gegen den RNAse-resistenten ENA-Anteil gerichteten Ak wurden im Ergebnisteil durchweg als "Sm"-Ak bezeichnet, obwohl nicht auszuschließen ist, daß diese Ak gegen SS-B (La) oder das Scl-70-Antigen gerichtet sind.

In der vorliegenden Arbeit wiesen 90 von 304 Patienten (30 %) ENA-Ak auf. Von 80 Patienten war genügend Serum für eine weitere Differenzierung der Ak vorhanden: Ak gegen RNP allein fanden sich bei 44 Patienten (55 %), bei 18 Patienten (22,5 %) waren die RNP-Ak mit einem weiteren Ak gegen die RNAse-resistente ENA-Fraktion kombiniert. Bei ebenfalls 18 Patienten (22,5 %) waren ausschließlich Ak gegen diese RNAse-resistente ENA-Fraktion nachweisbar (siehe Tabelle 6). Bei keinem der Patienten, bei denen Verlaufskontrollen durchgeführt werden konnten, zeigte sich ein Wechsel in der Antikörperreaktivität. Vergleichbare Ergebnisse liegen auch aus anderen Untersuchungen vor (19,61,82,83).

Die Häufigkeit von ENA-Ak bei einzelnen Kollagenosen konnte an einem Krankengut von insgesamt 171 Patienten mit gesicherter Diagnose untersucht werden. Tabelle 10 zeigt, daß alle fünf Patienten mit der klinischen Diagnose MCTD ENA-Ak aufwiesen; von den 30 Patienten mit SLE waren 14 (47 %) ENA-positiv. Ferner lagen bei 15 der 47 Patienten (32 %) mit kutanem LE ohne systemische Beteiligung (CDLE), bei 27 % der 73 Patienten mit PSS und bei einem der zehn Patienten mit Dermatomyositis (DM) ENA-Ak vor.

Vergleichbare Literaturangaben über die Häufigkeit von Ak gegen ENA bzw. gegen RNP bei verschiedenen Kollagenosen weichen teilweise erheblich voneinander ab.

20 % der hier untersuchten Patienten mit SLE (6/30) wiesen ausschließlich Ak gegen RNP, 13 % (4/30) Ak gegen RNP und den RNAse-resistenten ENA-Anteil und ebenfalls 13 % (4/30) Ak nur gegen letzteren auf.

RNP-Ak wurden bei SLE auch in anderen Untersuchungen ebenso häufig (19,83) oder sogar doppelt so häufig (61, 67,96,98,117) wie Ak gegen RNAse-resistentes ENA festgestellt, und gleichzeitiges Vorkommen mehrerer präzipitierender Ak gegen ENA ist bei SLE ebenfalls beschrieben (82, 96,117). SLE-Patienten mit RNP-Ak wird meist eine günstigere Prognose zugesprochen, wenn nicht zusätzlich Ak gegen Sm-, DNA oder andere ANA vorliegen (10,62,70,89,96,97,98,112,113, 117), da seltener eine Nierenbeteiligung auftritt. Powers et al. (88) haben gezeigt, daß SLE-Patienten mit Sm-Ak häufiger eine Glomerulonephritis (GN) entwickeln, die aber klinisch milde und nicht progressiv verläuft. Auch Ginsburg et al. (44) konnten bei SLE-Patienten mit Sm-Ak häufiger eine Nierenbeteiligung nachweisen als bei denen

mit RNP-Ak. In der Untersuchung von McCain et al. (69) war allerdings bei SLE mit und ohne Nierenbeteiligung kein Unterschied bezüglich der Häufigkeit von Sm-Ak festgestellt worden. Von Winn et al. (134) wird berichtet, daß der Krankheitsverlauf bei anti-Sm-positiven SLE-Patienten eher günstig ist und daß häufiger Raynaud-Syndrom und Sklerodaktylie, seltener ZNS-Beteiligung, Nephropathie und Hypertonie auftreten als bei SLE-Patienten mit DNA-Ak. Als Erklärung werden die starke Bindungsaffinität des Sm-Antigens für DNA und die mögliche Blockierung der DNA-anti-DNA-Immunkomplexbildung durch das Sm-Ag (in vitro) angeführt (46,78, 100). Im Experiment wurde bei NZB/NZW-Mäusen ein milderer Verlauf der Nephritis nach Injektionen von Sm-Ak nachgewiesen (78).

Von den hier untersuchten Patienten mit kutanem LE ohne Hinweis auf systemische Beteiligung wies ein relativ hoher Prozentsatz von 32 % (15/47) ebenfalls Ak gegen ENA auf. Davon hatten 6 Patienten (13 %)ausschließlich Ak gegen das RNP-Ag, 5 Patienten (11 %) Ak gegen RNAseresistentes ENA und nur 4 Patienten (9 %) Ak gegen beide ENA-Fraktionen. Aus der Literatur liegt nur eine Untersuchung über die Häufigkeit von ENA-Ak bei kutanem LE vor: Notman et al. (83) konnten bei dieser Erkrankung in 25 % Ak ausschließlich gegen RNP nachweisen.

Zwei Drittel der hier untersuchten ENA-positiven CDLE-Patienten zeigten ausgedehnte Hautveränderungen im Sinne eines LE chronicus superficialis disseminatus (LE subacutus), der in 2-10 % in SLE übergehen kann (13). Nach Meinung einiger Autoren (120) stellt der LE subacutus

eine milde Form des SLE dar, wobei systemische Manifestationen nicht im Vordergrund stehen. In der Untersuchung von Sontheimer et al. (120) waren 48 % der Patienten mit subakutem kutanem LE (= LE chronicus superfic. dissem.) gemäß den Kriterien der American Rheumatism Association (ARA) (25) als SLE-Fälle zu bezeichnen.

Der Nachweis von ENA-Ak war Anlaß dafür, die Krankengeschichten der als CDLE klassifizierten Patienten erneut durchzusehen. Dabei zeigte sich, daß bei 13 der 15 ENA-positiven CDLE-Patienten (87 %) neben discoiden oder disseminierten LE-Hautveränderungen ein oder zwei typische zusätzliche Befunde vorlagen, die zu den vorläufigen Kriterien der ARA zur Klassifikation des SLE (1971) zählen (25). Meist waren bei diesen Patienten erhöhte Photosensibilität, Leukozytopenie, Raynaud-Syndrom, Alopezie oder Schleimhautulcera beschrieben worden. In keinem Fall waren aber vier Kriterien, wie für die Diagnose SLE gefordert, erfüllt. Nach der 1982 revidierten und in einigen Punkten veränderten Fassung der ARA-Kriterien (125) weisen 11 der 15 ENA-positiven CDLE-Patienten jeweils drei SLE-typische Befunde auf. Zusätzlich erfüllt einer dieser Patienten vier Kriterien für die Diagnose SLE.

Es ist daher möglich, daß ENA-positive Patienten mit LE superficialis disseminatus (LE subacutus) eine Übergangsform zwischen dem rein kutanen und dem systemischen LE darstellen. Auch wurde in der Literatur mehrfach über die Entstehung einer MCTD bei Patienten berichtet, die ENA-positiv waren und anfänglich das klinische Bild eines kutanen LE boten (11,23,42).

Bei 27 % der untersuchten Patienten mit progressiver systemischer Sklerodermie (PSS) traten ENA-Ak auf. In etwa zwei Drittel der Fälle waren sie gegen das RNP-Ag gerichtet (Tabelle 11). Dieses Ergebnis stimmt gut mit dem anderer Untersucher überein, die bei PSS ENA-Ak mit einer Häufigkeit von 20-40 % beschrieben, überwiegend mit Spezifität für das RNP-Ag (54,61,82,83,85,113,129). Nach Sharp (108) sind bei 4 % der Sklerodermie-Patienten Sm-Ak nachweisbar. Im hier untersuchten Patientengut wurden neben RNP-Ak in einigen Fällen auch Ak gegen die RNAse-resistente ENA-Fraktion festgestellt (Tabelle 11), bei denen es sich um "Sm"- oder möglicherweise um SS-B (La)- oder Scl-70-Ak handelt.

Auch bei Patienten mit Dermatomyositis (DM) sind ENA-Ak, fast ausschließlich gegen das RNP-Ag gerichtet, in 1-20 % nachgewiesen worden (19,61,69,82,83,113). Nur selten wurden bei Dermatomyositis Ak gegen das Sm-Ag beschrieben (108,113). Im hier untersuchten Patientenkollektiv traten ENA-Ak bei DM in 10 % (ausschließlich RNP-Ak) auf.

Aus den Angaben in der Literatur (124) und den Ergebnissen dieser Untersuchung ist ersichtlich, daß RNP-Ak allein für keine der untersuchten Kollagenosen beweisend sind, auch nicht für das Sharp-Syndrom (MCTD), wie anfänglich vermutet wurde. Ak gegen RNP können bei allen Kollagenosen vorkommen (10,36,83,85,89,129), und daher kommt ihnen keine "marker"- Funktion für eine bestimmte Krankheit zu. Allerdings sind die RNP-Ak-Titer bei der MCTD in den meisten Fällen deutlich höher als bei anderen Kollagenosen (83) und sie sind nicht, wie vor allem bei SLE, mit anderen ANA (Sm-Ak, DNA-Ak etc.) assoziiert.

Reichlin (117) vertritt die Meinung, daß Ak gegen ENA, insbesondere RNP-Ak, nicht serologische "marker" für eine bestimmte Kollagenose, sondern vielmehr für eine bestimmte Symptomenkonstellation sind. In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde daher untersucht, inwieweit sich die klinische Symptomatik von Patienten mit Ak ausschließlich gegen RNP von dem klinischen Bild derjenigen Patienten unterscheidet, die Ak gegen die RNAse-resistente ENA-Fraktion oder gegen beide ENA-Bestandteile aufweisen.

Aus Tabelle 12 und Abb. 7 geht hervor, daß bei Patienten mit RNP-Ak am häufigsten Raynaud-Symptomatik, Akrozyanose, diffuse Schwellungen der Finger und Hände, Hautsklerosierungen, Fingerkuppennekrosen, Zungenbandsklerosierung, Mikrostomie, Teleangiektasien, Parästhesien, Lymphadenopathie und besonders Lungenbeteiligung und Ösophagusmotilitätsstörungen auftraten. Dagegen waren LE-Hauterscheinungen, Verdacht auf Nephropathie* , Serositis und Sicca-Syndrom bei Patienten mit Ak gegen die RNAse-resistente ENA-Fraktion häufiger als bei Patienten mit RNP-Ak nachweisbar, was gut mit den Beobachtungen anderer Untersucher übereinstimmt (44,62,89,96,113,126). Patienten mit Ak gegen beide ENA-Fraktionen nehmen für viele dieser Symptome gewissermaßen eine Mittelstellung in Bezug auf die Symptomenhäufigkeit ein. In der Häufigkeit des Auftretens von Gelenkbe-

*Eine Nephropathie wurde aufgrund erhöhter Serumkreatininwerte, signifikanter Proteinurie (>0,1 g/d) und in einigen Fällen aufgrund einer eingeschränkten Kreatininclearance vermutet. Den Beweis für eine GN kann aber letztlich nur die Nierenbiopsie liefern, die im untersuchten Patientenkollektiv nur in einem Fall durchgeführt worden war.

teiligung, Alopezie und Fieber sowie in den Laborwerten unterschieden sich die einzelnen Gruppen nur wenig (Tabelle 13/ Abb. 8).

Die Zusammenstellung der häufigsten Symptome bei Patienten mit RNP-Ak ähnelt auffällig dem Symptomenkomplex, den Sharp für die MCTD beschrieben hat (77,103,109,111,114, 117).

Schon seit den 50er Jahren hatte man sich in zunehmendem Maße für gemischte Bindegewebserkrankungen interessiert. Beobachtet wurden das gemeinsame Vorkommen von SLE und rheumatoider Arthritis (RA) (31,32a,56,118), von SLE und PSS (33,87,131), von SLE und DM (32b,57), von PSS und DM (24,79,130,131) und von RA und PSS (131). In den 60er Jahren entdeckten dann Sharp und Holman bei 25 Patienten mit einem Mischsyndrom, das Symptome des SLE, der Dermato/Polymyositis und der PSS umfaßte, hohe Titer komplementfixierender Ak gegen Bestandteile von Kalbsthymuszellen, die im Gegensatz zu den ANA bei Patienten mit "reinem" SLE auch in der Phase der klinischen Remission hoch blieben (112,114). In der IIF zeigten diese ANA immer ein gefleckte ("speckled") Kernbindungsmuster. Mittels der passiven Hämagglutination konnte gezeigt werden, daß die neu entdeckten ANA gegen Ribonukleoproteine gerichtet sind, die Teil eines 1965 von Holman partiell gereinigten und charakterisierten, in isotonen Puffern löslichen, extrahierbaren nukleären Antigengemisches (ENA) sind (50).

Die MCTD umfaßt klinische Merkmale des SLE, der PSS und der Dermato/Polymyositis (70), in der Regel mindestens zwei typische Symptome von zweien dieser Kollagenosen (23). In 80 % sind Frauen im mittleren Lebensalter betroffen (107,111,116), der Verlauf ist chronisch mit Neigung zu Rezidiven. Leitsymptome sind Raynaud-Phänomen, diffuse Hand- und Fingerschwellungen, Polyarthralgien und meist nicht-deformierende Polyarthritiden (45), Myalgien, proximale Muskelschwäche und erhöhte Muskelenzyme sowie Ösophagusmotilitätsstörungen und interstitielle Lungenfibrose, die oft asymptomatisch verlaufen und dann erst durch Funktions-

tests nachgewiesen werden können (48,133). Häufig findet man LE-Hauterscheinungen und periorbitale, an Dermatomyositis erinnernde livide Erytheme, seltener Sklerodermie, diffuse Alopezie, periunguale Teleangiektasien, Lymphadenopathie, Fieber und Serositis (9,70,75,77,103,109.111,113,114). Nur 10-15 % der Patienten entwickeln Nierenfunktionsstörungen und Glomerulonephritis wie bei SLE (97,112,113,114,127,136). Histologisch findet man meist benignere Formen der GN (14, 62,109,136). Auch ZNS-Beteiligung kommt in 10-30 % bei MCTD vor, seltener und in milderer Verlaufsform als bei SLE (109, 111,136). Sie äußert sich am häufigsten als aseptische Meningitis, als Trigeminusneuralgie oder als periphere Neuropathie (15).

Die häufigsten Laborbefunde bei MCTD sind BKS-Beschleunigung, polyklonale Hypergammaglobulinämie, mäßige Anämie und Leukozytopenie, positive Rheumafaktoren und im akuten Stadium erhöhte Muskelenzyme (109,111,114). Dagegen sind DNA-Ak nur sehr selten nachweisbar (136). Wegweisend sind hohe ANA-Titer mit gefleckтem Immunfluoreszenzmuster, ebenso hohe Ak-Titer gegen ENA im Hämagglutinationstest, die gegen die RNP-Fraktion des ENA gerichtet sind (109,111, 114). Der direkte Immunfluoreszenztest (DIF) von klinisch unbefallener Haut zeigt in fast allen Fällen die sogenannte epidermale Kernfluoreszenz: Ablagerungen von IgG-ANA mit gefleckтem Bindungsmuster in Epidermiszellkernen (40,41,43, 53,75,93,94,109,135). Dieser Befund stellt nach heutiger Auffassung möglicherweise ein in vivo-Phänomen dar, das durch einen zirkulierenden Permeabilitätsfaktor, der zu vermehrter Zellmembrandurchlässigkeit führt (53) verursacht wird oder aber durch aktives Eindringen von IgG-ANA über Fc-Rezeptoren der Zellmembran und Reaktion mit nukleärem RNP-Ag (4) zustande kommt.

Die Prognose der MCTD wurde ursprünglich als relativ günstig beurteilt (19,41,62,75,103,107,108,113,114). Verlaufsbeobachtungen über mehrere Jahre haben aber gezeigt, daß die Patienten häufig, bedingt durch proliferative und obliterierende Vaskulitis, eine pulmonale Hypertonie entwickeln, die die Lebenserwartung deutlich einschränkt (34). Bei Kindern ist der Verlauf einer MCTD eher bösartig, mit entzündlichen Gefäßveränderungen, Myokarditis, Nephritis und

ausgeprägter Thrombozytopenie (119). Die gute Ansprechbarkeit der MCTD auf Glukocorticoide wird immer wieder hervorgehoben, wobei LE-Hauterscheinungen leichter zu beeinflussen sind als Sklerodermie-Symptome (117,136). In Einzelfällen kann jedoch die Anwendung von Zytostatika notwendig werden (110,111,113,114).

Schon im Initialstadium der Erkrankung können alle Symptome der MCTD vorhanden sein. Jedoch gibt es auch klinisch uncharakteristische Frühstadien (77),oder Symptome des SLE, der PSS oder der chronischen Polyarthritis stehen im Vordergrund, bis nach jahrelangem Verlauf das Vollbild einer MCTD ausgeprägt ist (107,108,109). Besonders das Raynaud-Syndrom kann lange als einziges Symptom vorhanden sein, bevor irgendwelche anderen Krankheitsmanifestationen auftreten (85,109). Mehrfach wurde auch die Entwicklung einer MCTD aus einem LE integumentalis beschrieben (11,23,42). Die Bestimmung der ENA-Ak kann in der Frühphase der Erkrankung wichtige diagnostische Hinweise liefern (111,117).

Auch heute noch ist die Eigenständigkeit der MCTD umstritten (23,117,124). Einige Autoren halten sie für eine Sonderform des SLE (95,96,97,98,117), von anderen wird sie als entzündliche Verlaufsform der PSS angesehen (9). Gegen SLE sprechen vor allem Raynaud-Syndrom, Ösophagus- und Lungenbeteiligung, gegen PSS die LE-typischen Hautmanifestationen, Arthritis, Myositis und Lymphadenopathie. Allerdings haben Nachuntersuchungen ergeben, daß einige der von Sharp (114) beschriebenen MCTD-Patienten einen SLE mit Nierenbeteiligung und andere das klassische Bild einer PSS entwickelt haben (80). Nach Tan (124) sollte die Diagnöse MCTD nur bei Patienten mit hochtitrigen ANA bei gefleckten IIF-muster und mit epidermaler Kernfluoreszenz erwogen werden, in deren Seren ausschließlich Ak gegen RNP - nicht aber gegen andere Zellkernbestandteile - nachweisbar sind.

In den Tabellen 14 und 15 sind die klinischen und serologischen Befunde der fünf Patienten mit der klinischen Diagnose MCTD, die in dieser Arbeit untersucht werden konnten, noch einmal gesondert zusammengestellt. Die häufigsten Symptome sind im wesentlichen dieselben wie

bei den übrigen RNP-positiven Patienten; sie kommen bei MCTD allerdings kombiniert vor. Anders als bei den RNP-positiven Patienten mit LE oder PSS war bei allen MCTD-Patienten eine Arthropathie nachweisbar. Eine (asymptomatische) Lungenbeteiligung mit Störungen der Diffusionskapazität, die bei MCTD häufig beschrieben wird (48), konnte in keinem Fall festgestellt werden. Dies ist aber möglicherweise durch die kleine Fallzahl bedingt. Berichte über das seltene Auftreten von Nierenbeteiligung bei MCTD (97,112,113,114,127) konnten bestätigt werden: bei keiner der MCTD-Patientinnen ergaben die Laborwerte einen Hinweis auf Nephropathie. Periorbitale livide Erytheme, die an Dermatomyositis erinnerten, eine Autoimmunthyreoiditis sowie seltene Befunde wie Sweet-Syndrom traten nur bei einigen Patienten mit MCTD auf, nicht bei den anderen hier untersuchten Patienten mit ENA-Ak.

Kennzeichnend waren in allen fünf Fällen mit MCTD die serologischen Befunde: bei allen Patienten lagen Ak gegen RNP vor, in vier von fünf Fällen in ungewöhnlich hohen Titern. Ak gegen eine andere ENA-Fraktion konnten bei keiner Patientin nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist weiterhin, daß alle MCTD-Patienten hohe Titer (≥ 5120) von ANA mit ausschließlich gefleckten Kernbindungsmuster aufwiesen und in der direkten IF-Untersuchung aus nicht befallener Haut eine Kernfluoreszenz der Epidermiszellkerne zeigten.

Insbesondere aufgrund dieser Kombination ausgeprägter serologischer Veränderungen und der klinischen Mischsymptomatik konnten die Patienten mit MCTD von den anderen ENA-positiven Patienten mit SLE, kutanem LE oder PSS unterschieden werden.

Man kennt heute eine Vielzahl verschiedener Mischkollagenosen. Die MCTD ist nur eine davon. Sie kann durch serologische Befunde von anderen Überlappungssyndromen abgegrenzt werden. Unabdingbare Voraussetzung für die Diagnose MCTD ist der Nachweis von Ak gegen nukleäres Ribonukleoprotein (RNP). Die Diagnose Sharp-Syndrom sollte zudem nur dann gestellt werden, wenn außer RNP-Ak keine anderen ANA, insbesondere keine Ak gegen Sm oder DNA, nachweisbar sind. Die Bestimmung und Differenzierung der ENA-Ak ist somit eine wertvolle Hilfe für die Charakterisierung einer bestimmten Patientengruppe.

Schließlich ist der Nachweis von ENA-Ak, mehr noch als der Nachweis von ANA, bei Patienten mit ausgedehnten LE-Hautveränderungen als wichtiger Hinweis für eine beginnende systemische Beteiligung zu werten.

ZUSAMMENFASSUNG

795 Seren von 304 Patienten der Dermatologischen Klinik der Universität München, die im IIF-Test ANA mit Titern über 160 aufwiesen, wurden mittels der Immundiffusionstechnik auf präzipitierende Ak gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA) untersucht. Bei 30 % der Patienten waren ENA-Ak nachweisbar, überwiegend in Seren mit hohen ANA-Titern und geflecktem ("speckled") Kernbindungsmuster im IIF-Test. Bei über der Hälfte der ENA-positiven Patienten (55 %) waren die Ak gegen den RNAse-empfindlichen Ribonukleoproteinanteil (RNP) des ENA gerichtet, bei 22,5 % waren Ak gegen einen RNAse-resistenten ENA-Anteil und bei weiteren 22,5 % gegen beide ENA-Fraktionen nachweisbar.

Die Diagnose von 171 Patienten konnte klinisch gesichert werden. Bei 14 von 30 Patienten mit SLE (47 %), 15 von 47 Patienten mit discoiden oder disseminierten LE-Hautveränderungen (32 %), 20 von 73 Patienten mit progressiver systemischer Sklerodermie (27 %), einem von 10 Patienten mit Dermatomyositis (10 %) und bei fünf Patienten mit mixed connective tissue disease (100 %) traten ENA-Ak auf, die bei allen diesen Erkrankungen überwiegend gegen das RNP-Antigen gerichtet waren. Bemerkenswert war, daß die Mehrzahl der ENA-positiven Patienten mit disseminierten LE-Hautveränderungen eines oder mehrere Symtome des systemischen LE aufwies und damit möglicherweise eine Übergangsform zwischen der rein kutanen und der systemischen Form des SLE darstellt. Der Nachweis von ENA-Ak bei LE-Patienten mit disseminierten Hauterscheinungen sollte daher stets Anlaß für eine umfassende

Untersuchung und Überwachung der Patienten sein.

In der Gruppe aller Patienten mit Ak gegen RNP waren die folgenden Symptome besonders häufig vertreten: Raynaud-Syndrom, Akrozyanose, diffuse Schwellungen der Hände und Finger, Hautsklerosierung, Ösophagusmotilitätsstörungen, Lungenbeteiligung und LE-Hauterscheinungen. Bei Patienten mit Ak gegen die RNAse-resistente ENA-Fraktion bestabd dagegen häufiger der Verdacht auf Nephropathie.

Die fünf Patienten mit MCTD unterschieden sich aufgrund ausgeprägter serologischer Veränderungen (hohe ANA-Titer mit gefleckтem Immunfluoreszenzmuster, Ak ausschließlich gegen die RNP-Fraktion des ENA in relativ hohen Titern, epidermale Kernfluoreszenz) von anderen ENA-positiven Patienten mit Kollagenosen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. AARDEN, L.A., LAKMAKER, F., DE GROOT, E.R., SWAAK, A.J.G., FELTKAMP, T.E.W.:
   Detection of antibodies to DNA by radioimmunoassay and immunofluorescence
   Scand.J. Rheumatol. 11 (suppl.), 12-19 (1975)

2. AKIZUKI, M., POWERS, R., HOLMAN, H.R.:
   A soluble acidic protein of the cell nucleus which reacts with serum from patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome
   J. Clin. Invest. 59, 264-272 (1977)

3. AKIZUKI, M., POWERS, R., HOLMAN, H.R.:
   Comparative study of the immunologic methods for demonstration of antibodies to soluble nuclear antigens: Immunofluorescence, hemagglutination, complement fixation and immunodiffusion
   Arthritis Rheum. 20, 693-701 (1977)

4. ALCARON-SEGOVIA, D., RUIZ-ARGUELLES, A., FISHBEIN, E.:
   Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors.
   Nature, 271, 67-69 (1978)

5. ALEXANDER, E.L., PROVOST, T.T.:
   Ro (SS-A) and La (SS-B) antibodies
   Springer Semin. Immunopathol. 4, 253-273 (1981)

6. ALSPAUGH, M.A., MADDISON, P.:
   Resolution of the identity of certain antigen antibody systems in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: an interlaboratory collaboration
   Arthritis Rheum. 22, 796-798 (1979)

7. ALSPAUGH, M.A., TALAL, N., TAN, E.M.:
   Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome
   Arthritis Rheum. 19, 216-222 (1976)

8. ALSPAUGH, M.A., TAN, E.M.:
   Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome
   J. Clin. Invest. 55, 1067-1073 (1975)

9. BANDILLA, K.:
   Sklerodermie und Mischkollagenerkrankung (MCTD)
   Med. Welt 26, 2258-2262 (1975)

10. BARLAND, P., HAMBURGER, M., HODES, S.:
    The clinical significance of anti-Sm and anti-RNP antibodies
    Arthritis Rheum. 18, 384 (abstr.) (1975)

11. BAUER, R., SCHULTZ-EHRENBERG, V., ORFANOS, C.E.:
    Entwicklung einer "mixed connective tissue disease" (MCTD) aus einem Lupus erythematodes integumentalis
    Der Hautarzt, 32, 23-27 (1981)

12. BECK, J.S., ANDERSON, J.R., GRAY, K.G., ROWELL, N.R.:
Antinuclear and precipitating autoantibodies in progressive systemic sclerosis
Lancet 2, 1088-1090 (1963)

13. BENCZE, G.:
Relationship of systemic lupus erythematosus (SLE) to rheumatoid arthritis (RA), discoid lupus erythematosus (DLE) and Sjögren's syndrome. A clinical study
Acta Rheumatol. Scand. 16, 191-196 (1970)

14. BENNET, R.M., SPARGO, B.H.:
Immune complex nephropathie in mixed connective tissue disease
Am. J. Med. 63, 534-540 (1977)

15. BENNET, R.M., SPARGO, B.G.:
Neuropsychiatric problems in MCTD
Am. J. Med. 65, 955-962 (1978)

16. BERGQUIST, R.N.:
Antinuclear antibodies: Significance of titers
In: Immunopathology of the skin. Labeled antibody studies, Chap. 23. Beutner, E.H., Chorzelski, T.P., Bean, S.F., Jordon, R.E. (Hrsg.), S. 394-401. Stroudsburg: Dowden, Hutchington and Ross 1973

17. BLOCH, K.J.:
Sjögren's syndrome
In: Textbook of immunopathology, Band 2, Miescher, P.A., Müller-Eberhard, H.J. (Hrsg.), S. 1037-1042. New York: Grune & Stratton 1976

18. BLOMGREN, S.E., CONDEMI, J.J., VAUGHAN, J.H.:
Procainamide-induced lupus erythematosus
Am. J. Med. 52, 338-348 (1972)

19. BRESNIHAN, B., BUNN, C., SNAITH, M.L., HUGHES, G.R.:
Antiribonucleoprotein antibodies in connective tissue diseases: estimation by counterimmunelectrophoresis
Brit. Med. J. 1, 610-611 (1977)

20. BURNHAM, T.K.:
Antinuclear antibodies
II. The prognostic significance of nuclear immunofluorescent patterns in lupus erythematosus
Arch. Dermatol. 111, 203-207 (1975)

21. BURNHAM, T.K.:
Antinuclear antibodies. A simplified classification of the immunofluorescent patterns
Arch. Dermatol. 114, 1343-1344 (1978)

22. BURNHAM, T.K., BANK, P.W.:
Antinuclear antibodies
I. Patterns of nuclear immunofluorescence
J. Invest. Dermatol. 62, 526-234 (1974)

23. CHUBICK, A., GILLIAM, J.N.:
A review of mixed connective tissue disease
Int. J. Dermatol. 17, 123-133 (1978)

24. CLARK, J.A., WINKELMANN, R.K., WARD, L.E.:
Serologic alterations in scleroderma and sclerodermatomyositis
Mayo Clin. Proc. 46, 104-107 (1971)

25. COHEN, A.S., REYNOLDS, W.E., FRANKLIN, E.C., KULLER, J.P., SHULMAN, L.E., WALLACE, S.L.:
Preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus
Bull. Rheum. Dis. 21, 643-648 (1971)

26. DAVIS, P., RUSSELL, A.S., PERCY, J.S.:
A comparative study of the technics for the detection of antibodies to native desoxyribonucleic acid
Am. J. Clin. Pathol. 67, 374-378 (1977)

27. DENG, J.S., CHANG, J.Y., LÜ, Y.C.:
Clinical significance and correlation of antinuclear antibodies and anti-DNA antibodies
J. Dermatol. 6, 227-232 (1979)

28. DORSCH, C.A., GIBBS, C.B., STEVENS, M.B., SHULMAN L.E.:
Significance of nuclear immunofluorescent patterns
Ann. Rheum. Dis. 28, 313-319 (1969)

29. DORSCH, C.A., WHITE, G.M., BERZOFSKY, R.N.:
The measurement of antibodies to extractable nuclear antigen
Am. J. Clin. Pathol. 71, 333-337 (1979)

30. DOUVAS, A.S., STUMPH, W.E., REYES, P., TAN, E.M.:
Isolation and characterization of nuclear ribonucleoprotein complexes using human anti-nuclear ribonucleoprotein antibodies
J. Biol. Chem. 254, 3608-3616 (1979)

31. DUBOIS, E.L.:
Lupus erythematosus, lupoid syndromes and their relation to collagen diseases
Postgrad. Med. 32, 568-577 (1962)

32. DUBOIS, E.L.:
a. The relationship between systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Chap. 11, S. 464-476
b. The clinical picture of systemic lupus erythematosus. Chap. 9, S.232-379: Myositis and myopathy. S. 261-262
In: Lupus erythematosus. A review of the current status of discoid and systemic lupus erythematosus and their variants. 2nd ed., University of Southern California Press, Los Angeles 1974

33. DUBOIS, E.L., CHANDOR, S., FRIOU, G.J.:
Progressive systemic sclerosis (PSS) and localized scleroderma (morphea) with positive LE cell test and unusual systemic manifestations compatible with systemic lupus erythematosus
Medicine 50, 199-222 (1971)

34. ESTHER, J.H., SHARP, G.C., AGIA, G., HURST, D.J.:
Pulmonary hypertension in patients with connective tissue disease and antibody to nuclear ribonucleoprotein
Arthritis Rheum. 24, 105 (abstr.) (1981)

35. FABER, V., ELLING, P.:
Antinuclear factors (ANF) as determined by the immunofluorescent-antibody-technique
Acta Med. Scand. 177, 309-319 (1965)

36. FARBER, S.J., BOLE, G.G.:
Antibodies to components of extractable nuclear antigen: Clinical characteristics of patients
Arch. Intern. Med. 136, 425-431 (1976)

37. FRIOU, G.J.:
Clinical application of lupus serum - nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique
J. Clin. Invest. 36, 890-897 (1957)

38. FRIOU, G.J.:
Antinuclear antibodies: Diagnostic significance and methods
Arthritis Rheum. 10, 151-159 (1967)

39. GENTH, E.:
Die klinische Bedeutung von Antikörpern gegen doppelsträngige DNS
Dtsch. med. Wschr. 103, 1025-1027 (1978)

40. GILLIAM, J.N.:
The significance of cutaneous immunoglobulin deposits in lupus erythematosus and NZB/NZW F1 hybrid mice
J. Invest. Dermatol. 65, 154-161 (1975)

41. GILLIAM, J.N., PRYSTOWSKY, S.D.:
Mixed connective tissue disease syndrome: Cutaneous manifestations of patients with epidermal nuclear staining and high titer serum antibody to ribonuclease - sensitive extractable nuclear antigen
Arch. Dermatol. 113, 583-587 (1977)

42. GILLIAM, J.N., PRYSTOWSKY, S.D.:
Conversion of discoid lupus erythematosus to mixed connective tissue disease
J. Rheumatol. 4, 165-169 (1977)

43. GILLIAM, J.N., SMILEY, J.D., ZIFF, M.:
Correlation between serum antibody to extractable nuclear antigen and immunoglobulin localization in epidermal nuclei
Clin. Res. 22, 611 (abstr.) (1974)

44. GINSBURG, W.W., CONN, D.L., McDUFFIE, F.C.:
Comparison of clinical and serologic markers in systemic lupus erythematosus and overlap syndrome: a review of 247 patients
J. Rheumatol. 10, 235-241 (1983)

45. HALLA, J.T., HARDIN, J.G.;
Clinical features of arthritis of mixed connective tissue disease
Arthritis Rheum. 21, 497-508 (1978)

46. HAMBURGER, M., FRIEDLANDER, L., BARLAND, P.:
Interactions of extractable nuclear antigen (ENA) and double stranded DNA
Arthritis Rheum. 17, 469-475 (1974)

47. HARGRAVES, M.M., MORTON, R., RICHMOND, H.:
Presentation of two bone marrow elements: The "Tart" cell and the "LE" cell
Proc. Mayo Clin. 23, 25-28 (1948)

48. HARMON, C., WOLFE, J.F., LILLARD, S., HELD, C., CORDON, R., SHARP, G.C.:
Pulmonary involvement in mixed connective tissue disease
Arthritis Rheum. 19, 801 (abstr.)(1976)

49. HEGGLIN, R., SIEGENTHALER, W.:
Kollagenosen im engeren Sinn. In: Differentialdiagnose innerer Krankheiten. 13.Auflage, S. 148-154. Thieme, Stuttgart 1975

50. HOLMAN, H.R.:
Partial purification and characterization of an extractable nuclear antigen which reacts with SLE sera
Ann. NY. Acad. Sci. 124, 800-806 (1965)

51. HOPF, U., ARNOLD, W., MEYER zum BÜSCHENFELDE, K.H.:
Kritische Wertung humoraler Autoimmunphänomene
Dtsch. med. Wschr. 103, 1193-1195 (1978)

52. HUGHES, G., COHEN, C., CHRISTIAN, C.:
Anti-DNA activity in systemic lupus erythematosus: A diagnostic and therapeutic guide
Ann. Rheum. Dis. 30, 259-264 (1971)

53. IZUNO, G.T.:
Observations on the in vivo reaction of antinuclear antibodies with epidermal cells
Br. J. Dermatol. 98, 391-398 (1978)

54. JABLONSKA, S.J., CHORZELSKI, T.P., BLASZCZYK, M., GLINSKI, W.:
Immunologic phenomena in scleroderma
In: Immunopathology of the skin. 2nd ed. Chap. 19, Beutner, E.H., Chorzelski, T.P., Bean, S.F.(Hrsg.), S. 363-380. John Wiley & sons, New York 1979

55. KALDEN, J., ZIMMER, J., DEICHER, H.:
Die Bedeutung von Serum-Antikörpern gegen ds-DNS für Diagnostik und klinischen Verlauf von Patienten mit einem systemischen Lupus erythematodes
Inn. Med. 3, 5-12 (1976)

56. KANTOR, G.L., BICKEL, Y.B., BARNETT, E.V.:
Coexistence of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Report of a case and review of the literature with clinical, pathologic and serologic observations
Am. J. Med. 47, 433-444 (1969)

57. KEIL, H.:
Dermatomyositis and systemic lupus erythematosus. Comparative study of essential clinicopathologic features
Arch. Intern. Med. 66, 339-383 (1940)

58. KEINING, E., BRAUN-FALCO, O.:
Lupus erythematodes
In: Dermatologie und Venerologie, 2.Auflage, S. 506-512
J.F. Lehmanns Verlag, München 1969

59. KLEMPERER, P., POLLAK, A.P., BAEHR, G.:
Diffuse collagen disease: acute disseminated lupus erythematosus and diffuse scleroderma
J.A.M.A. 119, 331-332 (1942)

60. KOZIN, F., FOWLER, M.:
Identification of specific antibodies to extractable nuclear antigens by passive immunodiffusion
Am. J. Clin. Pathol. 71, 437-440 (1979)

61. KURATA, N., TAN, E.M.:
Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis
Arthritis Rheum. 19, 574-580 (1976)

62. LEIBFARTH, J.H., PERSELLIN, R.H.:
Characteristics of patients with serum antibodies to extractable nuclear antigens
Arthritis Rheum. 19, 851-856 (1976)

63. LERNER, E.A., LERNER, M.R., HARDIN, J.A., JANEWAY, C.A., STEITZ, J.A.:
Deciphering the mysteries of RNA-containing lupus antigens
Arthritis Rheum. 25, 761-766 (1982)

64. LIGHTFOOT, R., REDECHA, P., LEVESANOS, N.:
Longitudinal studies of anti-DNA antibody levels in systemic lupus erythematosus
Scand. J. Rheumatol. 11 (suppl.) 52-58 (1976)

65. LIGHTFOOT, R.W. jr., CHRISTIAN, C.L.:
Rheumatoid arthritis. In: Textbook of immunopathology, Band 2, Miescher, P.A., Müller-Eberhard, H.J. (Hrsg.) S. 1025-1036. New York, Grune & Stratton 1976

66. LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.:
Protein measurement with the Folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

67. MATTIOLI, M., REICHLIN, M.:
Characterization of a soluble nuclear ribonucleoprotein antigen reactive with SLE sera
J. Immunol. 107, 1281-1290 (1971)

68. MATTIOLI, M., REICHLIN, M.:
Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen
Arthritis Rheum 17, 421-429 (1974)

69. McCAIN, G.A., BELL, D.A., CHODIRKER, W.B., KOMAR, R.R.:
Antibody to extractable nuclear antigen in the rheumatic diseases
J. Rheuamtol. 5, 399-406 (1978)

70. MEURER, M., BRAUN-FALCO, O.:
Mixed connective tissue disease (Sharp-Syndrom)
Der Hautarzt (Suppl. V) 32. Jahrgang, 420-421 (1981)

71. MEURER, M., RING, J.:
Das Spektrum der antinukleären und antizytoplasmatischen Antikörper bei Kollagenosen
Der Hautarzt 31, 478-485 (1980)

72. MEYER zum BÜSCHENFELDE, K.H.:
Immunpathologische Sekundärphänomene bei Lebererkrankungen
In: Akute und chronische Lebererkrankungen, Begemann, H.R., Kühne, H.A. (Hrsg.) S. 133-139. Thieme, Stuttgart 1966

73. MIESCHER, P.A.:
Systemic lupus erythematosus. In: Textbook of immunopathology, Band 2, Miescher, P.A., Müller-Eberhard, H.J. (Hrsg.), S. 963-1002. New York: Grune & Stratton 1976

74. MIESCHER, P.A., FAUCONNET, M.:
L'absoption du facteur "LE" par des noyaux cellulaires isoles
Experentia (Basel) 10, 252-255 (1954)

75. MINKIN, W., RABHAN, N.:
Mixed connective tissue disease
Arch. Dermatol. 112, 1535-1538 (1976)

76. MIYACHI, K., TAN, E.M.:
Antibodies reacting with ribosomal ribonucleoprotein in connective tissue diseases
Arthritis Rheum. 22, 87-93 (1979)

77. MÖDDER, B., FELTKAMP, H., MIES, R., THIELE, K.G.:
Klinik, Diagnose, Differentialdiagnose und Therapie der Mischkollagenose (Sharp-Syndrom)
Med. Welt 31, 1305-1307 (1980)

78. MORRIS, A.D., LITTLETON, C., CORMAN, L.C., ESTERLY, J., SHARP, G.C.:
Extractable nuclear antigen effect on the DNA anti-DNA reaction and NZB/NZW mouse nephritis
J. Clin. Invest. 55, 903-907 (1975)

79. MULLER, S.A., WINKELMANN, R.K., BRUNSTING, L.A.:
Calcinosis in dermatomyositis. Observations on course of disease in children and adults
Arch. Dermatol. 79, 669-673 (1959)

80. NIMELSTEIN, S.H., BRODY, S.,McSHANE, D.:
Mixed connective tissue disease: a subsequent evaluation of the original 25 patients
Medicine (Baltimore) 59, 239-248 (1980)

81. NISENGARD, R.J.:
Antinuclear antibodies: Significance of titers. In: Immunopathology of the skin, 2nd ed., Chap. 21. Beutner, E.H., Chorzelski, T.P., Bean, S.F.(Hrsg.), S. 387-398. J. Wiley & Sons, New York 1979

82. NORTHWAY, J.D., TAN, E.M.:
Differentiation of antibodies giving speckled staining patterns in immunofluorescence
Clin. Immunol. Immunopathol. 1, 140-154 (1972)

83. NOTMAN, D.D., KURATA, N., TAN, E.M.:
Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases
Ann. Intern. Med. 83, 464-469 (1975)

84. OUCHTERLONY, Ö.:
Antigen-antibody reactions in gels: types of reactions in coordinated systems of diffusion
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 32, 231-240 (1953)

85. PARKER, M.D.:
Ribonucleoprotein antibodies: frequency and clinical significance in systemic lupus erythematosus, scleroderma and mixed connective tissue disease
J. Lab. Clin. Med. 82, 769-775 (1973)

86. PINNAS, J.L., NORTHWAY, J.D., TAN, E.M.:
Antinucleolar antibodies in human sera
J. Immunol. 111, 996-1004 (1973)

87. POLLACK, A.D.:
Visceral and vascular lesions in scleroderma
Arch. Path. 29, 859-863 (1940)

88. POWERS, R., AKIZUKI, M., BOEHM-TRUITT, V., HOLMAN, H.:
Substantial purification of the Sm-antigen and association of high titer antibody to Sm with a clinical subset of systemic lupus erythematosus (SLE)
Arthritis Rheum. 20, 131 (abstr.) (1977)

89. PROVOST, T.T.:
Subsets in systemic lupus erythematosus
J. Invest. Dermatol. 72, 110-113 (1979)

90. PROVOST, T.T., AHMED, A.R., MADDISON, P.J., REICHLIN, M.:
Antibodies to cytoplasmic antigens in lupus erythematosus. Serologic marker for systemic disease
Arthritis Rheum. 20, 1457-1463 (1977)

91. PROVOST, T.T., REICHLIN, M.:
Antinuclear antibody-negative systemic lupus erythematosus
J. Am. Acad. Dermatol. 4, 84-89 (1981)

92. PRYSTOWSKY, S.D., GILLIAM, J.N.:
Discoid lupus erythematosus as part of a larger disease spectrum. Correlation of clinical features with laboratory findings in lupus erythematosus
Arch. Dermatol. 111, 1448-1452 (1975)

93. PRYSTOWSKY, S.D., TUFFANELLI, D.L.:
Epidermal nuclear IgG deposition: Correlation of clinical features and laboratory findings in 47 patients.
Proc. XIV. Internat. Congr. Rheumatol., San Francisco

94. PRYSTOWSKY, D.D., TUFFANELLI, D.L.:
Speckled (particulate epidermal nuclear IgG deposition in normal skin : Correlation of clinical features and laboratory findings in 46 patients with a subset connective tissue disease characterized by antibody to extractable nuclear antigen (ENA)
Arch. Dermatol. 114, 705-710 (1978)

95. REICHLIN, M.:
Problems in differentiating SLE and mixed connective tissue disease
N. Engl. J. Med. 295, 1194-1195 (1976)

96. REICHLIN, M., MADDISON, P.J.:
Soluble tissue autoantigens which precipitate with sera of patients with connective tissue diseases. In: Immunopathology of the skin, 2nd ed., Chap. 18, Beutner, E.H., Chorzelski, T.P., Bean, S.F.(Hrsg.). S. 351-362. J. Wiley & Sons, New York 1979

97. REICHLIN, M., MATTIOLI, M.:
Correlation of a precipitin reaction to an RNAprotein antigen and a low prevalenne of nephritis in patients with systemic lupus erythematosus
N. Engl. J. Med. 286, 901-911 (1972)

98. REICHLIN, M., MATTIOLI, M.:
Antigens and antibodies characteristic of systemic lupus erythematosus
Bull. Rheum. Dis. 24, 756-760 (1975)

99. REICHLIN, M., MATTIOLI, M.:
Description of a serological reaction characteristic of polymyositis
Clin. Immunol. Immunopathol. 5, 12-20 (1976)

100. REYES, P.A., TAN, E.M.:
DNA-binding property of Sm nuclear antigen
J. Exp. Med. 145, 749-754 (1977)

101. RITCHIE, R.F.:
The clinical significance of titered antinuclear antibodies
Arthritis Rheum. 10, 544-551 (1967)

102. RITCHIE, R.F.:
Antinucleolar antibodies: Their frequency and diagnostic association
N. Engl. J. Med. 282, 1174-1178 (1970)

103. ROSENTHAL, M., MÜLLER, W.:
Das Sharp-Syndrom ("mixed connective tissue disease")
Schweiz. med. Wschr. 107, 1162-1165 (1977)

104. ROSENTHAL, M., STOJAN, B., MÜLLER, W.:
Differenzierung der antinukleären Antikörper zur Verbesserung der diagnostischen Aussagekraft
Dtsch. med. Wschr. 101, 379-384 (1976)

105. ROTHFIELD, N.F.:
The induction of antinuclear antibodies by isoniazid: a prospective study
Arthritis Rheum. 14, 182-183 (1971)

106. SELIGMAN, D.M., CANNAT, A., HAMARD, M.:
Studies on antinuclear antibodies
Ann. N.Y. Acad. Sci. 124, 816-832 (1965)

107. SHARP, G.C.:
Mixed connective tissue disease
Bull. Rheum. Dis. 25, 828-831 (1972)

108. SHARP, G.C.:
Mixed connective tissue disease - overlap syndromes
Clin. Rheum. Dis. 1, 561-572 (1975)

109. Sharp, G.C.:
Mixed connective tissue disease. In: Arthritis and allied conditions, 9th ed., Chap. 51, McCarty, D.J., (Hrsg.) S. 737-741. Lea & Febinger, Philadelphia 1979

110. Sharp, G.C.:
Mixed connective tissue disease. In: Current therapy in allergy and immunology, Lichtenstein, L.M., Fanci, A.S. (Hrsg.) S. 125-129, 1983-1984. Decker-Mosby Co. Philadelphia-St. Louis-Toronto

111. SHARP, G.C., ANDERSON, P.C.:
Current concepts in the classification of connective tissue diseases
J. Am. Acad. Dermatol. 2, 269-279 (1980)

112. SHARP, G.C., IRWIN, W.S., LaROQUE, R.L. et al.:
Association of autoantibodies to different nuclear antigens with clinical patterns of rheumatic disease and responsiveness to therapy
J. Clin. Invest. 50, 350-359 (1971)

113. SHARP, G.C., IRWIN, W.S., MAY, D.M., HOLMAN, H.R., McDUFFIE, F.C., HESS, E.V., SCHMID, F.R.:
Association of autoantibodies to ribonucleoprotein and Sm antigens with mixed connective tissue disease, systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases
N. Engl. J. Med. 295, 1149-1154 (1976)

114. SHARP, G.C., IRWIN, W.S., TAN, E.M., GOULD, R.G., HOLMAN, H.R.:
Mixed connective tissue disease - an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA)
Am. J. Med. 52, 148-159 (1972)

115. SHARP, G.C., IRWIN, W.S. et al.:
Specificity of antibodies to extractable nuclear antigen (ENA) in mixed connective tissue disease (MCTD) and systemic lupus erythematosus (SLE)
Arthritis Rheum. 15, 125 (abstr.) (1972)

116. SHARP, G.C., MAY, C., IRWIN, W.S., HOLMAN, H.R., McDUFFIE, F.C., HESS, E.V., SCHMID, F.R.:
Clinical and laboratory characteristics of patients with antibodies to the ribonucleoprotein (RNP) component of extractable nuclear antigen (ENA)
Arthritis Rheum. 16, 569 (abstr.) (1973)

117. SHARP, G.C., REICHLIN, M., TUFFANELLI, D.L.:
Mixed connective tissue disease: Three views. In: Immunopathology of the skin, 2nd ed., Chap. 16, Beutner, E.H., Chorzelski, T.P., Bean, S.F., S. 327-335. J. Wiley & Sons, New York 1979

118. SIGLER, J.W., MONTO, R.W., ENSIGN, D.C. et al.:
The incidence of the LE-cell phenomenon in patients with rheumatoid arthritis (a two year study)
Arthritis Rheum. 1, 115-121 (1958)

119. SINGSEN, B.H., BERNSTEIN, B.H., KORNREICH, H.K., KING, K.K., HANSON, V., TAN, E.M.:
Mixed connective tissue disease in childhood
J. Pediatr. 90, 893-900 (1977)

120. SONTHEIMER, R.D., THOMAS, J.R., GILLIAM, J.N.:
Subacute cutaneous lupus erythematosus. A cutaneous marker for a distinct lupus erythematosus subset
Arch. Dermatol. 115, 1409-1415 (1979)

121. TAN, E.M.:
Relationship of nuclear staining patterns with precipitating antibodies in systemic lupus erythematosus
J. Lab. Clin. Med. 70, 800-812 (1967)

122. TAN, E.M.:
Drug-induced autoimmune disease
Fed. Proc. 33, 1894-1897 (1974)

123. TAN E.M.:
Antinuclear antibodies: Significance of biochemical specificities. In: Immunopathology of the skin, 2nd ed., Chap. 17. Beutner, E.H., Chorzelski, T.P., Bean, S.F., S. 337-349. J. Wiley & Sons, New York 1979

124. TAN, E.M.:
Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine
Adv. Immunol. 33, 167-240 (1982)

125. TAN, E.M., COHEN, A.S., FRIES, J.F., MASI, A.T., McSHANE, D.J., ROTHFIELD, N.F., SCHALLER, J.G., TALAL, N., WINCHESTER, R.J.:
The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus
Arthritis Rheum. 25, 1271-1277 (1982)

126. TAN, E.M., KUNKEL, H.G.:
Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus
J. Immunol. 96, 464-471 (1966)

127. TAN, E.M., NORTHWAY, J.D., PINNAS, J.L.:
The clinical significance of antinuclear antibodies
Postgrad. Med. 54, 143-150 (1973)

128. TAN, E.M., REYES, P., FRITZLER, M.J.:
Autoantibodies as biological markers. In: Biological markers of neoplasia: Basic and applied aspects. Ruddon, A. (Hrsg.), S. 399-408. Amsterdam : Elsevier North Holland 1978

129. TAN, E.M., RODNAN, G.P.:
Profile of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis
Arthritis Rheum. 18, 430 (abstr.) (1976)

130. TUFFANELLI, D.L., WINKELMANN, R.K.:
Systemic scleroderma: A clinical study of 727 cases
Arch.Dermatol. 84, 359-371 (1961)

131. TUFFANELLI, D.L., WINKELMANN, R.K.:
Scleroderma and its relationship to the collagenoses: Dermatomyositis, lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome
Am. J. Med. Sci. 243, 133-145 (1962)

132. WINFIELD, J.B., KOFFLER, D., KUNKEL, H.G.:
Role of DNA-anti-DNA complexes in the immunopathogenesis of tissue injury in SLE
Scand. J. Rheumatol. 11 (suppl.) 59-64 (1975)

133. WINN, D., GERHARD, D., WINSHIP, D., SHARP, G.C.:
Esophageal function in steroid treated patients with mixed connective tissue disease (MCTD)
Clin. Res. 24, 545 (abstr.) (1976)

134. WINN, D.M., WOLFE, J.F., LINDBERG, D.A., FRISTOL, F.H., KINGSLAND, L., SHARP, G.C.:
Identification of a clinical subset of systemic lupus erythematosus by antibodies to the Sm antigen
Arthritis Rheum. 22, 1334-1337 (1979)

135. WOLFE, F.J., ADELSTEIN, E., SHARP, G.C.:
Antinuclear antibodies with distinct specificity for polymyositis
J. Clin. Invest. 59, 176-178 (1977)

136. WOLFE, J.F., KINGSLAND, L., LINDBERG, D.A., SHARP, G.C.:
Disease pattern in patients with antibodies only to nuclear ribonucleoprotein (RNP)
Clin. Res. 25, 488 (abstr.) (1977)

137. WOLFE, J.F., SHARP, G.C.:
Antinuclear antibody with distinct specificity in polymyositis
Arthritis Rheum. 19, 830 (abstr.) (1976)

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. O. Braun-Falco danke ich für die Vergabe dieses Dissertationsthemas und die Möglichkeit, die Arbeit an der Dermatologischen Klinik durchzuführen.

Bei Herrn Prof. Dr. G.H. Thoenes möchte ich mich für die Überlassung einiger Seren und die freundliche Beratung bedanken.

Herrn Dr. M. Meurer gilt mein besonderer Dank für die freundliche Betreuung bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit.

Für die liebenswürdige Unterstützung bei den Laborarbeiten bedanke ich mich bei Frau Heilmann, die durch die routinemäßige Bestimmung der ANA diese Arbeit erst ermöglichte.

Lebenslauf

Ich, Eva Angelika Dittler, wurde am 2.5.1954

in Fürstenfeldbruck geboren.

Vater : Wilhelm E. Dittler, Ltd. Regierungsdirektor
Mutter: Anneliese Dittler (geb. Pulfer), Hausfrau

1960-63 Grundschule in Augsburg
1964-65 Grundschule in Eggenfelden
1965-67 Neusprachliches Gymnasium Eggenfelden
1967-74 Neusprachliches Gymnasium Berchtesgaden
1974 Abitur
1974-82 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (in den ersten drei Semestern zusätzlich Englisch/Französisch)

Mai 1982 3. Abschnitt des medizinischen Staatsexamens
4.6.1982 Approbation
1982-83 Promotionsstudium an der LMU München